



# Exploration des mécanismes de régulation du tonus vasculaire par les phosphodiesterases des nucléotides cycliques et de leur altérations dans un modèle d'insuffisance cardiaque

Sarah Idres

## ► To cite this version:

Sarah Idres. Exploration des mécanismes de régulation du tonus vasculaire par les phosphodiesterases des nucléotides cycliques et de leur altérations dans un modèle d'insuffisance cardiaque. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS293 . tel-01884172

**HAL Id: tel-01884172**

**<https://theses.hal.science/tel-01884172>**

Submitted on 30 Sep 2018

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

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

NNT : 2017SACL293

Thèse de doctorat

# Exploration des mécanismes de régulation du tonus vasculaire par les phosphodiesterases des nucléotides cycliques et de leurs altérations dans un modèle d'insuffisance cardiaque

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
Préparée à la Faculté de Pharmacie de Paris-Sud

Ecole doctorale n°569  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : physiopathologie cellulaire et moléculaire

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 29 septembre 2017 par

**Sarah Idres**

Composition du Jury :

|                                                                                                                                               |                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>Denis David</b><br>Professeur des Universités,<br>Université Paris-Sud (UMR-S 1178)                                                        | Président             |
| <b>Bijan Ghaleh-Marzban</b><br>Professeur des Universités, Praticien Hospitalier<br>Institut Mondor de Recherche Biomédicale<br>(INSERM U955) | Rapporteur            |
| <b>Christelle Guibert</b><br>Chargé de Recherche<br>Université de Bordeaux (INSERM U1045)                                                     | Rapporteur            |
| <b>Claire Lugnier</b><br>Directrice Recherche Emérite<br>Université de Strasbourg (UMR CNRS 7213)                                             | Examineur             |
| <b>Véronique Leblais</b><br>Professeur des Universités<br>Université Paris-Sud (UMR-S 1180)                                                   | Directeur de thèse    |
| <b>Boris Manoury</b><br>Maîtres de Conférences<br>Université Paris-Sud (UMR-S 1180)                                                           | Co-Directeur de thèse |

## Remerciements

*L'unique moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en remerciant fortement toutes les personnes qui ont cru en moi, qui m'ont soutenue et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette grande aventure que constitue la thèse.*

*J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury. D'abord le Dr. Christelle Guibert et le Pr. Bijan Ghaleh-Marzban, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon manuscrit et à l'élaboration de leurs rapports. Sans oublier le Dr. Claire Lugnier et le Pr. Denis David pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.*

*Je souhaiterai remercier le Dr. Rodolphe Fischmeister pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, d'abord en tant que stagiaire puis en tant que doctorante. Merci pour tes conseils et les discussions scientifiques lors des réunions d'équipes du vendredi. J'ai toujours été admirative devant ta passion pour la recherche, ton grand savoir, tes qualités humaines et ton accessibilité.*

*Je souhaiterai exprimer ma profonde gratitude à mon responsable et encadrant depuis le master, Boris Manoury. Une aventure qui dure depuis presque 5 ans maintenant ! Tu m'as fait découvrir la recherche et ce n'était qu'un pur bonheur ! Tes qualités scientifiques exceptionnelles mêlées à ta gentillesse et ta clairvoyance ont été la clé de la réussite et l'aboutissement de ma thèse. Tes conseils avisés et toujours constructifs m'ont permis de me former à la gestion d'un projet scientifique dans le respect de la rigueur que cela exige. Je n'oublierai jamais ton soutien et ta disponibilité dans les moments de doute malgré tes nombreuses charges.*

*Sa grande zénitude et son grand sourire m'ont toujours rassurée dans les périodes de stress intense ! Merci Véro ! J'avais commencé un peu l'aventure avec toi en me faisant visiter le labo pour la toute première fois, il y'a de cela 5 ans... Merci pour ta disponibilité et tes conseils avisés tout au long de mon aventure à l'UI180.*

*Je souhaiterai remercier Ana-maria pour m'avoir initiée à l'enregistrement des sparks calciques et pour avoir mis à ma disposition le microscope confocale. Je remercie également Patriko pour m'avoir formée à l'utilisation de ce dispositif, sans oublier Valérie Nicolas pour les conseils en imagerie par fluorescence.*

*J'exprime aussi tous mes remerciements aux membres de l'équipe 2 : Grégoire Vandecasteele, Jérôme Leroy et Catherine Brenner pour leurs conseils scientifiques, Guillaume Pidoux pour m'avoir initiée à la technique du PLA et m'avoir prêté tes boîtes transparentes pour les incubations ;). Merci à Audrey Varin pour m'avoir initiée aux techniques du western blot et de*

la PCR, à Françoise, maintenant à la retraite, merci pour ta gestion administrative spectaculaire. Un grand merci à Flo et à Valérie pour les chirurgies de sténose aortique, Sophie pour ta gentillesse et ton soutien, sans oublier Vincent Algalarrondo et Bertrand Crozatier. Un grand merci aux membres du Burex pour les fou rires qu'on a eu ensemble et pour votre soutien : Delphina, ton style subtile restera à jamais gravé dans ma mémoire, Ibrahim ou 'bibbi' pour les intimes, merci pour tes conseils professionnels ;), Germain, merci d'avoir fait ton M2 dans notre équipe, tes jeux de mots me font toujours aussi rire, Milia, présente dès le début de ma thèse, merci pour tes encouragements même après ton départ, Marion et Marine, merci pour votre gentillesse et votre sourire au quotidien. Sans oublier Martina et Lianguy Zhangy qui ont grandement contribué à la bonne ambiance au Burex:).

Je souhaiterai aussi remercier mes collègues de bureau au deuxième étage pour leur soutien surtout pendant la dernière ligne droite (la fin de la thèse), le formidable climat de travail qu'ils ont pu créer grâce à leur bonne humeur quotidienne. Notamment, Julie, merci pour les Pom'Potes et tes encouragements ! Sans toi, la mission reliure de ma thèse n'aurait peut-être pas été accomplie avec succès :), Lucile, merci de m'avoir fait découvrir les lunch 'Picard', Max, tes taquineries quotidiennes vont me manquer, comme pour les débats culinaires avec Robin. Fiona, toujours là pour 'ne pas me' filer une crème pour les mains ou un éventuel élastique pour les cheveux :) j'ai pris beaucoup de plaisir à partager avec toi mes conseils beauté ... 'Make Up Forever en Force' ;)

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents qui m'ont toujours soutenue et cru en moi. Ils ont fait de moi la femme que je suis par leur éducation et leur présence au quotidien malgré la distance, leur tendresse, leur intelligence et leur affection. Vous avez tout partagé avec moi pendant cette thèse : les moments de joie et les périodes difficiles. Vos conseils ont su me guider, me reconforter et me rassurer dans les moments de doute.

Merci à ma sœur et à mon frère pour leur soutien, leur affection. Je sais que je suis parfois insupportable surtout en période de stress mais vous avez tenu bon et c'est très bien ! Et enfin, je remercie mon mari, ma moitié pour sa présence reconfortante, ses encouragements. Toujours bienveillant à mon égard, tu es arrivé tout juste au bon moment dans ma vie.

U1180, c'est avec un petit pincement au cœur que je vous fais mes adieux. Je vous laisse en souvenir papier : ma thèse et en mémoire tous les bon moments que nous avons partagés ensemble !



## Résumé

**Mots clés :** phosphodiesterase, canaux potassiques BK<sub>Ca</sub>, insuffisance cardiaque, artère coronaire.

**Résumé :** Les nucléotides cycliques (NC) apparaissent comme des régulateurs majeurs du tonus vasculaire. Produits dans les cellules musculaires lisses (CMLs) par les cyclases, les NC agissent par l'intermédiaire des protéines effectrices qui modulent de nombreux mécanismes régulateurs de la vasomotricité. Les phosphodiesterases (PDEs) qui dégradent les NC assurent le contrôle spatiotemporel de leur réponse biologique.

L'objectif de mon travail était de préciser les mécanismes par lesquels le tonus artériel est contrôlé par certaines PDEs. J'ai réalisé cette exploration en utilisant des artères coronaires ou mésentériques de rat, en situation physiologique puis dans un modèle d'insuffisance cardiaque (IC) chronique. Dans la première partie de mon travail, nous nous sommes intéressés au mécanisme par lequel les PDE3 et PDE4 régulent le tonus de l'artère coronaire. Par une approche expérimentale plus intégrée de réactivité vasculaire sur artère coronaires isolées, nous avons montré l'importance du canal potassique BK<sub>Ca</sub> dans l'effet relaxant des inhibiteurs de PDE3 et PDE4. De plus, nous avons constaté une contribution différentielle de ces canaux selon le mode de stimulation de la génération d'un NC, l'AMPc. A l'échelle de la CML, notre étude a permis de suggérer l'existence d'un signalosome impliquant les PDE3/PDE4 et du canal potassique BK<sub>Ca</sub>, indiqué par la

technique de *Proximity Ligation Assay*. En accord avec cette hypothèse, le contrôle des BK<sub>Ca</sub> par ces PDEs a pu être mis en évidence par la technique du patch-clamp. De manière intéressante, la contribution du couplage fonctionnel entre le canal BK<sub>Ca</sub> et les PDE3 et PDE4 n'a pas été retrouvée dans les artères isolées de rats atteints d'IC. Ceci pourrait être expliqué par une diminution de l'expression des canaux BK<sub>Ca</sub> ainsi que, au moins partiellement, par une raréfaction de leur localisation à proximité de la PDE4B.

Dans la deuxième partie de mon travail nous avons exploré les rôles des PDE3, PDE4 et de la PDE2 en particulier, dans la régulation du tonus de l'artère mésentérique de rats atteints d'IC, en comparaison aux rats contrôles. En effet, la contribution de la PDE2 est suggérée par la capacité d'un inhibiteur sélectif de cette enzyme à diminuer la réponse des artères isolées à une stimulation vasocontractante. Nous avons ensuite exploré les effets de cet inhibiteur dans d'autres types de réponses impliquant les NC.

L'ensemble de ces travaux ajoute un niveau de complexité à la compréhension des mécanismes de la régulation de la vasomotricité des artères de résistance par les PDEs. Les altérations de cette voie de signalisation que nous avons mises en évidence dans l'IC pourraient contribuer à la dysfonction vasculaire qui accompagne la maladie.

## Abstract

**Keywords:** phosphodiesterase, BK<sub>Ca</sub> channel, heart failure, coronary artery.

**Abstract :** Cyclic nucleotides (CN) appears to be important regulator of vascular tone. Produced in smooth muscle cells (SMCs) by cyclases, CN act through activation of key effectors involved in the regulation of vascular tone. Phosphodiesterases (PDEs), which degrade CN, provide spatiotemporal control of their biological responses. The aim of my work was to understand how vascular tone is controlled by some PDEs and how it is altered during heart failure (HF). For this, I used rat coronary and mesenteric arteries.

In the first part of my work, we were interested in defining the contribution of PDE3 and PDE4 in the regulation of coronary tone. Using vascular reactivity technique, we demonstrate the importance of BK<sub>Ca</sub> channel in the relaxant effect of PDE3 and PDE4 inhibitor. Moreover, their contribution was different depending on the mode of cAMP production, a type of CN. At the cellular level, Proximity Ligation Assay experiments suggest the existence of a signalosome that involves PDE3/PDE4 and

large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel (BK<sub>Ca</sub>). According to this result, the control of BK<sub>Ca</sub> activity by these PDEs was demonstrated using the Patch-Clamp technique. Interestingly, the contribution of the functional coupling involving the BK<sub>Ca</sub> and PDE3/PDE4 is lost during HF. This may be explained by the decrease of BK<sub>Ca</sub> expression and [BK<sub>Ca</sub>-PDE4B] duplex signal in coronary arteries isolated from HF rat.

In the second part of my work, we investigated the role of PDE3, PDE4 and PDE2 particularly, in the regulation of rat mesenteric artery tone during HF. In fact, PDE2 selective inhibitor, decreased the contractile response of isolated arteries. Then, we investigated the effect of PDE2 inhibition in other pathway that involve CN. Our findings underline the complexity of PDEs in the regulation of resistance artery tone. During HF, some CN signaling pathway are impaired leading to vascular dysfunction which can aggravate the pathology.



## Liste des abréviations

|                                      |                                                                            |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> | Concentration de Ca <sup>2+</sup> intracellulaire                          |
| <b>5-HT</b>                          | Sérotonine                                                                 |
| <b>AA</b>                            | Acide arachidonique                                                        |
| <b>AC</b>                            | Adénylate cyclase                                                          |
| <b>Ach</b>                           | Acétylcholine                                                              |
| <b>AKAP</b>                          | <i>A-Kinase anchoring protein</i> - Protéine d'ancrage de la PKA           |
| <b>AMP</b>                           | Adénosine monophosphate                                                    |
| <b>AMPC</b>                          | 3',5'-adénosine monophosphate cyclique                                     |
| <b>AMPK</b>                          | <i>AMP-activated protein kinase</i>                                        |
| <b>ANP</b>                           | <i>Atrial natriuretic peptide</i>                                          |
| <b>AT II</b>                         | Angiotensine II                                                            |
| <b>BH<sub>4</sub></b>                | Tétrahydrobioptérine                                                       |
| <b>BK</b>                            | Bradykinine                                                                |
| <b>BK<sub>Ca</sub></b>               | <i>Large-conductance Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels</i> |
| <b>BNP</b>                           | <i>Brain natriuretic peptide</i>                                           |
| <b>BPCO</b>                          | Bronchopneumopathie obstructive chronique                                  |
| <b>Ca<sup>2+</sup>/CaM</b>           | Complexe Ca <sup>2+</sup> - calmoduline                                    |
| <b>CaM</b>                           | Calmoduline                                                                |
| <b>CAMKII</b>                        | Ca <sup>2+</sup> /CaM de type II                                           |
| <b>CE</b>                            | Cellule endothéliale                                                       |
| <b>Chtx</b>                          | Charybdotoxine                                                             |
| <b>CICR</b>                          | <i>Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release</i>                     |
| <b>CML</b>                           | Cellule musculaire lisse                                                   |
| <b>CMLV</b>                          | Cellule musculaire lisse vasculaire                                        |
| <b>CNBD</b>                          | <i>Cyclic nucleotide-binding domain</i>                                    |
| <b>COX</b>                           | Cyclooxygénase                                                             |
| <b>CYP450</b>                        | Cytochrome P450                                                            |
| <b>DAG</b>                           | Diacylglycérol                                                             |
| <b>ECE</b>                           | Enzyme de conversion de l'endothéline                                      |
| <b>EDCF</b>                          | <i>Endothelium-derived contracting factors</i>                             |
| <b>EDHF</b>                          | <i>Endotheliumd-derived hyperpolarizing factor</i>                         |
| <b>EDRF</b>                          | <i>Endothelium-derived relaxing factors</i>                                |

**EET** : Acide époxyeicosatriénoïque

**ENac** : Canal sodique épithélial

**eNOS**: NO synthase endothéliale

**Epac** : *Exchange Protein Directly Activated by cAMP* - Facteur d'échange nucléotidique directement activé par l'AMPc

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**ET-1** : Endothéline-1

**ETA et ETB** : Récepteurs de l'endothéline de type A et de type B respectivement

**GC** : Guanylate cyclase

**GCc** : Guanylate cyclase cytosolique

**GCp** : Guanylate cyclase particulaire

**GDP** : Guanine diphosphate

**GEF** : *Guanine Nucleotide Exchange Factor*

**GMPc** : 3',5' guanosine monophosphate cyclique

**GRK** : *G-protein coupled receptor kinase* - Kinase des récepteurs couplés aux protéines G

**GTP** : Guanosine-triphosphate

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HTA** : Hypertension artérielle

**HTAP** : Hypertension artérielle pulmonaire

**HUVEC** : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

**IBTX** : Ibériotoxine

**IC** : Insuffisance cardiaque

**IK<sub>ca</sub>** : *Intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated channels* – Canaux potassiques de conductance intermédiaire actives par le Ca<sup>2+</sup>

**IP** : Récepteur des Prostacyclines

**IP3** : Inositol 1,4,5 tri-phosphate

**IP3R** : Inositol 1,4,5 tri-phosphate

**IRAG** : *IP3 receptor-associated cGMP kinase substrate*

**K<sub>ATP</sub>** : *ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels*

**KHD** : *Kinase like homology domain*

**K<sub>IR</sub>** : *Inward rectifier K<sup>+</sup> Channels*

**K<sub>v</sub>** : *Voltage-gated K<sup>+</sup> channels*

**AMPK** : *AMP-activated Protein kinase*

**LE** : Limitante élastique

**LRR** : *Leucine-rich repeat domain*

**LTCC** : *L-type calcium channel*

**MAPK** : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

**MBS** : Sous-unité MYPT1

**MC** : Muscle cardiaque

**MLCK** : Kinase de la chaîne légère de la myosine

**MLCP** : Phosphatase de la chaîne légère de la myosine

**MLC** : *Myosin Light Chain* – chaîne légère de myosine

**ML** : Muscle lisse

**MRP** : *Multidrug resistance-associated protein*

**MS** : Muscle squelettique

**MYPT** : *Myosin Phosphatase Target*

**NA** : Noradrenaline

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NBD** : *Nucleotide binding domain*

**NC** : Nucléotide cyclique

**NHR** : *N-terminal hydrophobic region*

**NO** : Monoxyde d'azote

**NOS** : NO synthase

**NO<sup>2-</sup>** : Nitrite

**NO<sup>3-</sup>** : Nitrate

**NPR** : *Natriuretic Peptide Receptor* - Récepteur des peptides natrurétiques

**NPY** : Neuropeptide Y

**O<sup>2-</sup>** : Anion superoxyde

**P** : Purines

**PDE** : Phosphodiesterase

**PGI<sub>2</sub>** : Prostacycline

**RhoK** : Rho Kinase

**PIP<sub>2</sub>** : Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate

**PKA** : Protéine kinase A

**PKC** : Protéine kinase C

**PKG** : Protéine kinase G

**PLA<sub>2</sub>** : Phospholipase A<sub>2</sub>

**PLB** : Phospholamban

**PLC** : Phospholipase C

**PMCA** : *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*

**PRKX**: *Human X chromosome-encoded protein kinase X*

**RCPG** : Récepteur couplé à une protéine G

**REM** : *Ras Exchange Motif*

**RyR** : Récepteur à la ryanodine

**SERCA** : *Sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase* - ATPases calcium dépendantes du réticulum sarcoplasmique

**SK<sub>ca</sub>** : *Small-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated channels* - Canaux potassiques à faible conductance activés par le  $\text{Ca}^{2+}$

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SR** : Réticulum sarcoplasmique

**STOC** : *Spontaneous transient outward current* – courant sortant spontané

**STREX** : *Stress axis-regulated Exon*

**SUR** : *Sulfonylurea receptor*

**SUR2B** : *Sulfonylurea receptor 2B*

**T** : Thrombine

**TEA** : Tétréthylammonium

**TRP** : Transient Receptor Potential

**TXA<sub>2</sub>** : Thromboxane A<sub>2</sub>

**UCR** : *Upstream conserved Region*

**UCR** : *Upstream conserved region*

**VIP** : Peptide intestinal vasoactif

**VP** : Vasopressine

**$\alpha$ -ARs** : Récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques

**$\beta$ -ARs** : Récepteurs  $\beta$ -adrénergiques

## Liste des figures

**Figure 1 :** Représentation schématique de la circulation systémique (rouge) et pulmonaire (bleue).

**Figure 2 :** Localisation des principales artères coronaires humaines.

**Figure 3 :** Structure de la paroi vasculaire.

**Figure 4 :** Représentation schématique d'une CML dans un état relâché et dans un état contracté.

**Figure 5 :** Régulation de la phosphorylation de la MLC20 par la MLCP et la MLCK.

**Figure 6 :** Représentation schématique du mécanisme de contraction dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Figure 7 :** Représentation schématique des voies de sensibilisation de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$  (voies d'inhibition de l'activité de la MLCP).

**Figure 8 :** Rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus des CMLs.

**Figure 9 :** Voies de synthèse des prostanoides.

**Figure 10 :** Effet du *shear stress* sur la eNOS.

**Figure 11 :** Structure de l'AMPc et du GMPc.

**Figure 12 :** Structure schématique de l'adénylate cyclase membranaire.

**Figure 13 :** Représentation schématique de la structure des NPR.

**Figure 14 :** Représentation schématique des 11 familles de PDE.

**Figure 15 :** Représentation schématique de la structure et des voies de régulation des isoformes de PDE3.

**Figure 16 :** Représentation schématique de la structure des 4 groupes de PDE4.

**Figure 17 :** structure de la sous-unité  $\alpha$  du canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ .

**Figure 18 :** Structure de la sous-unité  $\beta$  du canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ .

**Figure 19 :** Représentation de la probabilité d'ouverture du canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  ( $\text{FP}_0$ ) en fonction de palier de dépolarisation croissant (exprimé en mV) à différentes  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

**Figure 20 :** Role des canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  dans les CMLVs.

**Figure 21 :** Dissection de la ACG.

**Figure 22:** Composition du myographe DMT 620 M.

**Figure 23 :** Représentation de la configuration «cellule attachée» (à gauche) et «inside out» (à droite) en patch-clamp.

**Figure 24 :** Etape de la technique de PLA.

**Figure supplémentaire 1 :** Activité PDE-AMPc dans les artères coronaires gauches de rat.

**Figure supplémentaire 2 :** Effet de l'inhibition des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  sur la réponse relaxante des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 dans les segments d'ACG de rat dépourvus d'endothélium fonctionnel.

**Figure supplémentaire 3 :** Effet de l'inhibition des  $\text{K}_v$  sur la réponse relaxante des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 dans les segments d'ACG de rat dépourvus d'endothélium fonctionnel.

**Figure supplémentaire 4 :** Effet de l'inhibition de PDE4 sur la réponse relaxante induite par des concentrations cumulatives d'isoprénaline en présence de ryanodine (Rya) ou de son véhicule (control) sur des segments d'ACG.

**Figure 1R :** Dosage de l'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.

**Figure 2R :** Réponse contractile à des concentrations cumulatives de PGF2 $\alpha$  dans les aortes isolées de rats SHAM et IC.

**Figure 3R :** Réponse contractile à des concentrations cumulatives d'U46619 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.

**Figure 4R :** Effet de l'inhibition de la PDE2, PDE3 et PDE4 sur la réponse contractile induite par des concentrations cumulatives d'U46619 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM (A, B) et IC (C, D).

**Figure 5R :** Effet de l'inhibition de PDE2 sur la réponse relaxante induite par des concentrations cumulatives de DEA-NO (A, C) et d'ANP (B, D) dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM (A, B) et IC (C, D).

**Figure 6R :** Effet de l'inhibition de PDE2 sur la réponse relaxante induite par des concentrations cumulatives d'isoprénaline ou de L85 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM (A) et IC (B).

**Figure 1D :** Schéma récapitulatif du rôle des canaux BK<sub>Ca</sub> dans la régulation du tonus de l'artère coronaire basale par les PDE3 et PDE4.

**Figure 2D :** Schéma récapitulatif du rôle des canaux BK<sub>Ca</sub> dans la régulation du tonus de l'artère coronaire par les PDE3 et PDE4 sous stimulation  $\beta$ -adrénergique (A) et activation des adénylates cyclases (B).

**Figure 3D :** Schéma récapitulatif de la dérégulation du couplage BK<sub>Ca</sub>-PDE3/PDE4 dans l'insuffisance cardiaque.

## Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Structure comparative des vaisseaux sanguins.

**Tableau 2 :** Caractéristiques biochimiques des PDEs.

**Tableau 3 :** Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés dans les différentes expériences.

**Tableau 4 :** Composition des solutions de « Krebs », « 0Ca<sup>2+</sup> » et « K80 ».

**Tableau 5 :** Composition des solutions utilisés pour les expériences de patch-clamp.



# Table des matières

|                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Liste des abréviations</b> .....                                                                                          | p3  |
| <b>Liste des figures</b> .....                                                                                               | p7  |
| <b>Liste des tableaux</b> .....                                                                                              | p8  |
| <b>Introduction</b> .....                                                                                                    | p14 |
| <b>1. Physiologie et pharmacologie de la circulation</b> .....                                                               | p15 |
| <b>1.1. Description anatomique et histologique</b> .....                                                                     | p15 |
| 1.1.1. La circulation coronaire .....                                                                                        | p16 |
| 1.1.1.1. Description de la circulation coronaire.....                                                                        | p16 |
| 1.1.1.2. Propriétés de la circulation coronaire .....                                                                        | p17 |
| 1.1.2. Structure de la paroi vasculaire .....                                                                                | p18 |
| 1.1.3. Organisation du réseau artériel .....                                                                                 | p20 |
| <b>1.2. Physiologie et rôle du muscle lisse vasculaire</b> .....                                                             | p21 |
| 1.2.1. Description du muscle lisse vasculaire .....                                                                          | p21 |
| 1.2.2. Description et fonction de la CML .....                                                                               | p22 |
| 1.2.3. Mécanisme moléculaire de contraction de la CML .....                                                                  | p23 |
| 1.2.4. Voies de contraction de la CML .....                                                                                  | p25 |
| 1.2.4.1. Contraction dépendante du $\text{Ca}^{2+}$ .....                                                                    | p25 |
| 1.2.4.1.1. Contraction suite à une initiation pharmaco-mécanique .....                                                       | p26 |
| 1.2.4.1.2. Contraction suite à une initiation électro-mécanique .....                                                        | p27 |
| 1.2.4.2. Mécanisme de contraction par sensibilisation au $\text{Ca}^{2+}$ .....                                              | p29 |
| 1.2.4.2.1. Voie d'inhibition de l'activité de la MLCP (sensibilisation de l'appareil contractile au $\text{Ca}^{2+}$ ) ..... | p30 |
| 1.2.4.2.2. Voies d'activation de la MLCP (désensibilisation de l'appareil contractile au $\text{Ca}^{2+}$ ) .....            | p31 |
| <b>1.3. Effecteurs de la relaxation vasculaire</b> .....                                                                     | p32 |
| 1.3.1. Diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .....                                                                           | p32 |
| 1.3.2. Hyperpolarisation du potentiel de membrane .....                                                                      | p33 |
| 1.3.2.1. Les $\text{K}_v$ .....                                                                                              | p33 |
| 1.3.2.2. Les $\text{K}_{\text{ATP}}$ .....                                                                                   | p34 |
| 1.3.2.3. Les $\text{K}_{\text{ir}}$ .....                                                                                    | p35 |
| 1.3.2.4. Les $\text{BK}_{\text{Ca}}$ .....                                                                                   | p35 |
| 1.3.3. Diminution de la phosphorylation de la MLC20 .....                                                                    | p36 |
| <b>1.4. Mécanisme de régulation de la vasomotricité</b> .....                                                                | p36 |
| 1.4.1. Régulation nerveuse .....                                                                                             | p36 |
| 1.4.1.1. Régulation par le système sympathique .....                                                                         | p36 |
| 1.4.1.2. Régulation par le système parasympathique .....                                                                     | p37 |
| 1.4.1.3. Régulation par le système nerveux sensoriel .....                                                                   | p37 |
| 1.4.2. Régulation hormonale : rôle de l'endothélium .....                                                                    | p37 |
| 1.4.2.1. Les EDRFs, facteurs relaxants dépendants de l'endothélium .....                                                     | p38 |
| 1.4.2.1.1. Le monoxyde d'azote .....                                                                                         | p38 |
| 1.4.2.1.2. Les prostacyclines ( $\text{PGI}_2$ ).....                                                                        | p40 |
| 1.4.2.1.3. EDHF ( <i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> ).....                                                   | p41 |

|                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.4.2.1.4. Les EDCFs, facteurs contractants dépendants de l'endothélium.....            | p41        |
| 1.4.3. Régulation par les contraintes de cisaillement ou shear stress.....              | p43        |
| 1.4.4. Régulation par étirement de la paroi vasculaire : rôle du tonus myogénique ..... | p43        |
| 1.4.5. Régulation par des facteurs métaboliques .....                                   | p44        |
| 1.4.5.1. L'oxygène.....                                                                 | p44        |
| 1.4.5.2. L'adénosine .....                                                              | p45        |
| <b>1.5. Altérations vasculaires associées à l'insuffisance cardiaque.....</b>           | <b>p46</b> |
| 1.5.1. Définition et épidémiologie de l'IC .....                                        | p46        |
| 1.5.2. Physiopathologie de l'IC .....                                                   | p46        |
| 1.5.3. Altérations vasculaires associées à l'IC.....                                    | p47        |
| <b>2. Voies des nucléotides cycliques dans le système vasculaire.....</b>               | <b>p49</b> |
| <b>2.1. Voie de l'AMPc .....</b>                                                        | <b>p49</b> |
| 2.1.1. Voie de synthèse de l'AMPc .....                                                 | p49        |
| 2.1.1.1. Les adénylates cyclases.....                                                   | p49        |
| 2.1.1.2. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....                                     | p51        |
| 2.1.1.2.1. Rôle et distribution des $\beta$ -ARs au niveau vasculaire.....              | p52        |
| 2.1.1.2.2. Régulation de l'activité des $\beta$ -ARs .....                              | p52        |
| 2.1.2. Les effecteurs vasculaires de l'AMPc.....                                        | p54        |
| 2.1.2.1. La protéine kinase A.....                                                      | p54        |
| 2.1.2.2. Le facteur d'échange Epac .....                                                | p56        |
| <b>2.2. Voie du GMPc .....</b>                                                          | <b>p57</b> |
| 2.2.1. Voie de synthèse du GMPc.....                                                    | p57        |
| 2.2.1.1. Les guanylates cyclases solubles .....                                         | p58        |
| 2.2.1.2. Les guanylates cyclases particulières .....                                    | p58        |
| 2.2.2. Les protéines kinases G, protéines effectrices du GMPc .....                     | p60        |
| <b>2.3. Hydrolyse des NCs par les phosphodiesterases .....</b>                          | <b>p61</b> |
| 2.3.1. La PDE2 .....                                                                    | p64        |
| 2.3.1.1. Caractéristiques générales .....                                               | p64        |
| 2.3.1.2. Modulation pharmacologique de l'activité PDE2 .....                            | p64        |
| 2.3.1.3. Rôle de la PDE2 dans la régulation du tonus vasculaire .....                   | p65        |
| 2.3.2. La PDE3 .....                                                                    | p66        |
| 2.3.2.1. Caractéristiques générales.....                                                | p66        |
| 2.3.2.2. Modulation pharmacologique de l'activité PDE3 .....                            | p66        |
| 2.3.2.3. Rôle de la PDE3 dans la régulation du tonus vasculaire .....                   | p68        |
| 2.3.3. La PDE4.....                                                                     | p70        |
| 2.3.3.1. Caractéristiques générales .....                                               | p70        |
| 2.3.3.2. Modulation pharmacologique de l'activité de PDE4.....                          | p71        |
| 2.3.3.3. Rôle de la PDE4 dans la régulation du tonus vasculaire.....                    | p72        |
| <b>2.4. Efflux des NCs par les MRPs.....</b>                                            | <b>p73</b> |
| <b>2.5. Altération de la voie des NCs dans l'IC.....</b>                                | <b>p73</b> |
| <b>3. Les canaux potassiques BK<sub>Ca</sub>.....</b>                                   | <b>p76</b> |
| <b>3.1. Présentation des BK<sub>Ca</sub> .....</b>                                      | <b>p76</b> |
| <b>3.2. Les canaux BK<sub>Ca</sub> dans les CMLVs et leur rôle physiologique.....</b>   | <b>p79</b> |
| 3.2.1. Expression et propriétés des BK <sub>Ca</sub> .....                              | p79        |
| 3.2.2. Mode d'activation des BK <sub>Ca</sub> en condition physiologique .....          | p80        |
| 3.2.3. Régulation physiologique de l'activité des BK <sub>Ca</sub> .....                | p83        |

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.3.1. Régulation par les kinases .....                                           | p82        |
| 3.2.3.2. Mécanismes alternatifs de régulation .....                                 | p83        |
| 3.2.3.2.1. Les hormones stéroïdiennes .....                                         | p83        |
| 3.2.3.2.2. Les ERO .....                                                            | p85        |
| 3.2.3.2.3. Le NO et CO .....                                                        | p85        |
| 3.2.3.2.4. L'acide arachidonique et ses métabolites .....                           | p85        |
| 3.2.3.2.5. Les protons H <sup>+</sup> .....                                         | p86        |
| 3.2.4. Régulation pharmacologique de l'activité des BK <sub>Ca</sub> .....          | p86        |
| 3.2.4.1. Les inhibiteurs des canaux BK <sub>Ca</sub> .....                          | p86        |
| 3.2.4.1.1. Les cations H <sup>+</sup> , Cs, Ba <sup>2+</sup> .....                  | p86        |
| 3.2.4.1.2. Le tétraéthylammonium (TEA) .....                                        | p87        |
| 3.2.4.1.3. Les toxines .....                                                        | p87        |
| 3.2.4.2. Les activateurs des canaux BK <sub>Ca</sub> .....                          | p88        |
| 3.2.5. Importance des BK <sub>Ca</sub> dans la régulation du tonus vasculaire ..... | p88        |
| <b>Objectifs</b> .....                                                              | <b>p91</b> |
| <b>Matériels et méthodes</b> .....                                                  | <b>p93</b> |
| 1. Modèle expérimental .....                                                        | p94        |
| 2. Agents pharmacologiques .....                                                    | p96        |
| 3. La réactivité vasculaire .....                                                   | p97        |
| 3.1. Dispositif utilisé .....                                                       | p97        |
| 3.2. La calibration .....                                                           | p98        |
| 3.3. La normalisation .....                                                         | p98        |
| 3.4. Solution utilisées .....                                                       | p98        |
| 3.5. Protocole expérimentale .....                                                  | p99        |
| 3.6. Collection et traitement des données brutes .....                              | p101       |
| 4. Patch-clamp .....                                                                | p101       |
| 4.1. Principe .....                                                                 | p101       |
| 4.2. Solutions utilisées .....                                                      | p102       |
| 4.3. Dispositif utilisé .....                                                       | p102       |
| 4.4. Protocole .....                                                                | p103       |
| 4.5. Traitement des données .....                                                   | p103       |
| 5. Méthodes biochimiques .....                                                      | p104       |
| 5.1. Extraction des protéines .....                                                 | p104       |
| 5.2. Dosage des protéines .....                                                     | p104       |
| 6. Dosage de l'activité PDE-AMPC .....                                              | p104       |
| 6.1. Principe .....                                                                 | p105       |
| 6.2. Protocole .....                                                                | p105       |
| 6.3. Analyse des résultats .....                                                    | p106       |

|                                                                                                                                                                                      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>7. Western blot</b>                                                                                                                                                               | p106 |
| 7.1. Principe                                                                                                                                                                        | p106 |
| 7.2. Protocole                                                                                                                                                                       | p107 |
| 7.3. Analyse des données                                                                                                                                                             | p108 |
| <b>8. Proximity Ligation Assay</b>                                                                                                                                                   | p109 |
| 8.1. Principe                                                                                                                                                                        | p109 |
| 8.2. Protocole                                                                                                                                                                       | p109 |
| 8.2.1. Isolement des CMLVs                                                                                                                                                           | p109 |
| 8.2.2. Fixation des CMLVs                                                                                                                                                            | p110 |
| 8.2.3. Perméabilisation et quenching                                                                                                                                                 | p110 |
| 8.2.4. Protocole de PLA                                                                                                                                                              | p110 |
| 8.2.5. Observation des lames                                                                                                                                                         | p110 |
| 8.3. Analyse des images                                                                                                                                                              | p111 |
| <b>9. Analyse statistique des données</b>                                                                                                                                            | p112 |
| <b>Résultats</b>                                                                                                                                                                     | p113 |
| <b>Projet I : Rôle des PDE3 et PDE4 dans la régulation de la vasomotricité de l'artère coronaire : implication des BK<sub>Ca</sub> et évolution lors de l'insuffisance cardiaque</b> | p114 |
| 1. Introduction                                                                                                                                                                      | p114 |
| 2. Resultats                                                                                                                                                                         | p116 |
| 2.1. Article « Contribution of BK <sub>Ca</sub> channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure »                                                     | p117 |
| 2.2. Présentation synthétique des résultats supplémentaires                                                                                                                          | p118 |
| 2.2.1. Caractérisation du profil d'activité d'hydrolyse de l'AMPc dans l'artère artères coronaires de rat                                                                            | p118 |
| 2.2.2. Rôle des BK <sub>Ca</sub> dans la réponse relaxante induite par l'inhibition de la PDE3 et PDE4 dans l'artère coronaire gauche                                                | p119 |
| 2.2.3. Rôle des BK <sub>Ca</sub> dans l'effet potentialisateur des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 sur la réponse β-adrénergique                                                         | p121 |
| 3. Conclusion                                                                                                                                                                        | p122 |
| <b>Projet II : rôle des PDEs-AMPc dans la régulation du tonus vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque : Étude d'un modèle de vaisseau résistif, l'artère mésentérique</b>    | p124 |
| 1. Introduction                                                                                                                                                                      | p124 |
| 2. Résultats                                                                                                                                                                         | p124 |
| 2.1. Mesure de l'activité PDE-AMPc dans les artères mésentériques de rats SHAM et IC                                                                                                 | p125 |

|                                                                                                                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.2. Effet de l'inhibition des PDEs sur la réponse contractile des segments d'artères mésentériques de rats SHAM et IC.....                                     | p127 |
| 2.3. Effet de l'inhibition de la PDE2 sur la réponse relaxante à l'ANP et DEA-NO dans les segments d'artères mésentériques de rats SHAM et IC .....             | p127 |
| 2.4. Effet de l'inhibition de la PDE2 sur la réponse relaxante à l'isoprénaline et au L858051 dans les segments d'artères mésentériques de rats SHAM et IC..... | p131 |
| 3. Conclusion.....                                                                                                                                              | p132 |
| Discussion et perspectives.....                                                                                                                                 | p134 |
| Conclusions.....                                                                                                                                                | p148 |
| Bibliographie.....                                                                                                                                              | p150 |

# Introduction

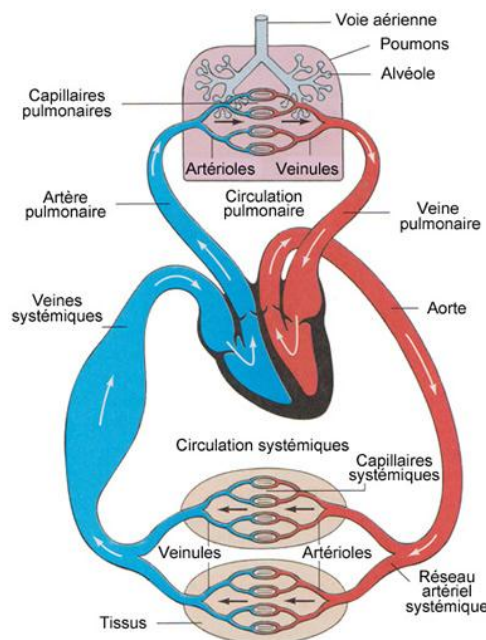
# **1. Physiologie et pharmacologie de la circulation**

## **1.1. Description anatomique et histologique**

Le système cardiovasculaire assure l'apport de l'oxygène et des nutriments aux différentes cellules de l'organisme. Il joue un rôle important dans la défense de l'organisme, l'hémostase et la communication cellulaire en véhiculant les cellules immunitaires, les anticorps, les facteurs de coagulation et les hormones. Il est en charge de l'élimination des métabolites toxiques et du CO<sub>2</sub>. Enfin, il contribue au maintien de la température et du pH sanguin à des valeurs stables garantissant le bon fonctionnement des systèmes de l'organisme.

Schématiquement, l'appareil cardio-vasculaire se compose d'une pompe à fonctionnement alternatif (le cœur), d'un réseau de distribution à haute pression (les artères), d'un circuit de petits vaisseaux au niveau desquels s'effectuent les échanges (les capillaires), et d'un circuit de retour à basse pression vers le cœur (les veines) (Marieb, 2005).

Le système vasculaire est composé de deux types de circulation (Figure 1) : la circulation systémique (ou grande circulation) qui assure l'approvisionnement des organes en sang oxygéné et la circulation pulmonaire qui permet la réoxygénation du sang veineux arrivant par l'artère pulmonaire (ou petite circulation) (Marieb, 2005).



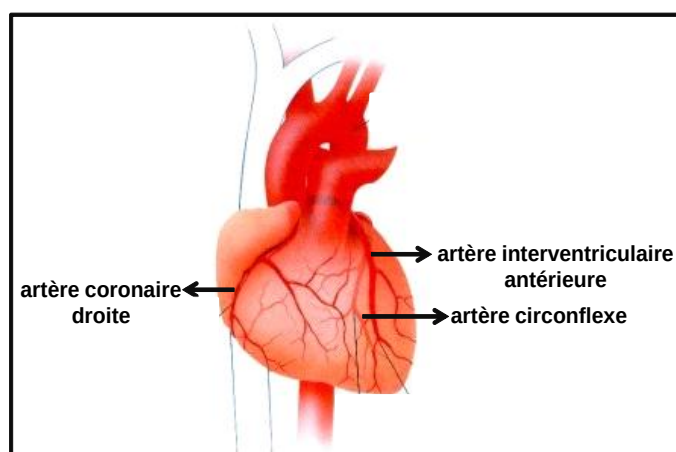
**Figure 1 : Représentation schématique de la circulation systémique (rouge) et pulmonaire (bleue).**

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:  $R=8l\eta/\pi r^4$  ( $\eta$  : 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.

### **1.1.1. La circulation coronaire**

#### **1.1.1.1. Description de la circulation coronaire**

La circulation systémique contribue à l'irrigation fonctionnelle du cœur par la circulation coronarienne. Elle naît au niveau du sinus de Valsalva (sinus aortique) puis se ramifie en deux formant une artère coronaire gauche et une artère coronaire droite (Figure 2). L'artère coronaire gauche irrigue le côté gauche du myocarde puis elle donne le rameau interventriculaire antérieur et le rameau circonflexe de l'artère coronaire gauche. L'artère coronaire droite s'étend vers le côté droit du muscle cardiaque, ou elle émet deux ramifications : le rameau marginal droit et le rameau interventriculaire postérieur.



**Figure 2 : Localisation des principales artères coronaires humaines.**  
(<http://www.prevention.ch/langioplastiecoronaire.htm>)



Les artères coronaires fournissent au myocarde un apport intermittent et rythmique. Ces vaisseaux et leurs principales ramifications sont logés dans l'épicaire ou juste en dessous, et leurs branches pénètrent dans le myocarde pour l'irriguer. L'existence d'une circulation collatérale épicaire anastomosant entre elle les différentes branches du réseau coronaire (Elayda et al., 1985) est maintenant bien établie. Cette circulation est peu développée puisqu'elle est représentée par des vaisseaux de très petit diamètre (40  $\mu\text{m}$ ) à faible débit néanmoins elle trouve son importance lors d'une sténose (infarctus du myocarde) (Charney and Cohen, 1993) à condition qu'elle se constitue très progressivement. En effet, une occlusion qui se forme brutalement est susceptible d'entraîner un infarctus transmural étendu, alors que si elle se forme progressivement, elle causera moins de dommages car la circulation colatérale aura le temps de prendre le relais très tôt lors de l'accident ischémique. Dans certain cas, la circulation colatérale est tellement efficace qu'elle peut cacher la survenue de certaines coronaropathies sévères.

#### **1.1.1.2. Propriétés de la circulation coronaire**

L'artère coronaire irrigue un muscle en continuel exercice et doté d'un métabolisme aérobie très élevé nécessaire à son activité contractile. C'est pourquoi, la circulation coronaire possède des propriétés spécifiques en lien avec sa fonction. Elles se résument comme suit :

- **Variation du débit coronaire au cours du cycle cardiaque :** Le débit coronaire au repos représente 4-5 % du débit cardiaque soit environ 250 mL/mn. La circulation coronaire varie de façon importante au cours du cycle cardiaque. En effet, lors de la systole, la pression endocardique au niveau du ventricule gauche est élevée (120 mmHg) et entraîne par conséquent la compression du réseau artériel coronaire de cette région, limitant ainsi son approvisionnement en sang. Ce phénomène n'est pas observé dans le réseau coronaire épicaire car non soumis à la variation de pression dans le ventricule gauche. La diastole permet de rétablir un flux coronaire continu. Du fait de l'hétérogénéité de la répartition des pressions intramyocardique, la circulation coronaire peut être qualifiée de cyclique dans le temps. Le rétablissement d'un flux coronaire normal durant la diastole explique les effets néfastes de la tachycardie lors des cardiopathies ischémiques puisque l'augmentation de la fréquence cardiaque se fait au dépend d'un raccourcissement de la durée de la diastole et par conséquent, d'une amputation du temps réservé à la vasorelaxation coronaire. Quant à la perfusion du ventricule droit et des oreillettes, elle est continue du fait que même durant la systole, la pression régnant au sein de ces cavités est faible et n'empêche donc pas la vasorelaxation coronaire (Chassot et al., 2010).

- **Adaptation du débit coronaire au besoin du myocarde en O<sub>2</sub>** : elle se produit essentiellement par le biais d'une vasodilatation. La consommation myocardique en O<sub>2</sub> dépend comme pour tous les autres organes de son débit de perfusion et de sa capacité d'extraction de l'O<sub>2</sub>. Cependant, le myocarde est un organe particulier car il est en continuel exercice donc sa capacité d'extraction de l'O<sub>2</sub> par ses cellules est déjà maximale et dépend donc de la variation du débit de perfusion (Brion et al., 2013). Le débit coronaire est calculé en faisant le rapport entre la pression aortique et les résistances coronaires. La pression aortique demeure stable, seule la diminution des résistances coronaires augmente le débit coronaire. Par conséquent, lors de l'effort, le débit coronaire est augmenté grâce à une vasodilatation coronaire maximale, réponse qui est 4 à 5 fois plus élevée qu'une vasodilatation en temps de repos (Brion et al., 2013).

### **1.1.2. Structure de la paroi vasculaire**

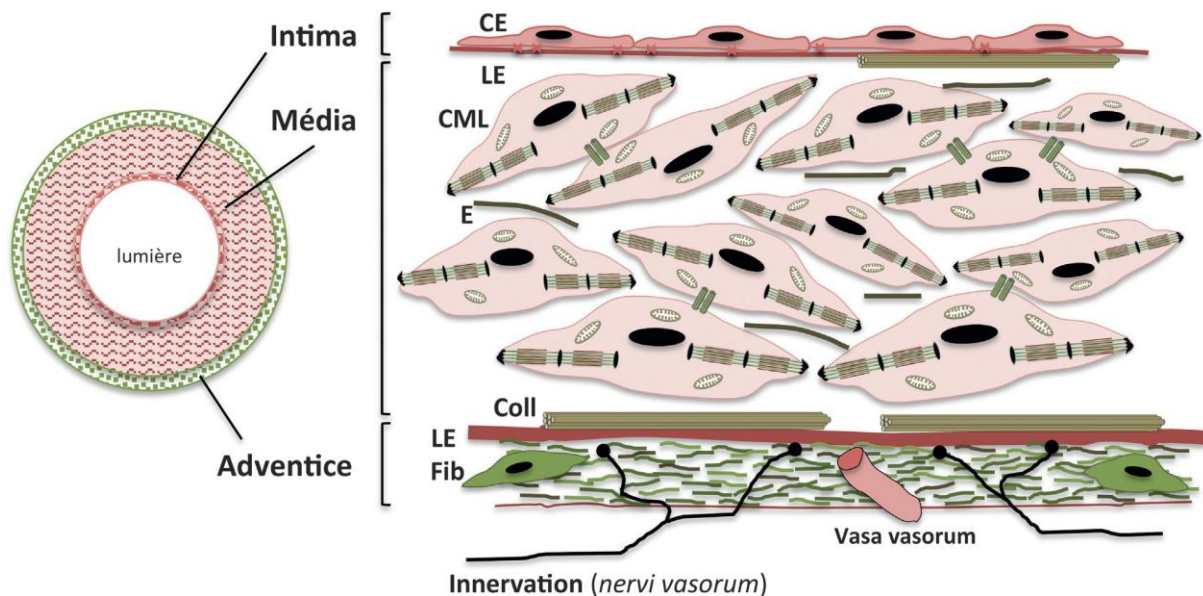
Les parois des artères et veines, sauf des capillaires, sont composées de trois couches ou tuniques morphologiquement distinctes et hautement structurées (Figure 3).

- **La tunique interne ou intima**, est composée d'une couche de cellules épithéliales pavimenteuses qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions intercellulaires et reposent sur une fine couche de tissu conjonctif lâche appelée limitante externe (Movat and Fernando, 1963). L'endothélium représente une surface d'échange évaluée à 280 et 350 m<sup>2</sup> (Pries and Kuebler, 2006). En absence de contraintes mécaniques, les cellules endothéliales (CEs) ont une forme polygonale, cependant lorsque le flux circulant impose des forces de cisaillement, elles deviennent allongées pour orienter leur grand axe dans le sens du flux. Ce phénomène est notamment observé dans les artères de conductance où le flux est laminaire et les contraintes de cisaillement présentes (rapport longueur/largeur des cellules endothéliales d'environ 4) mais aussi reproduit dans des modèles de cultures de cellules endothéliales sous flux (Bachetti and Morbidelli, 2000). L'endothélium réagit aux modifications chimiques, physiques et humorales qui surviennent dans son environnement par la synthèse et la libération de nombreux facteurs impliqués dans la modulation de l'angiogenèse, l'inflammation, l'hémostase, la perméabilité et le tonus vasculaire (Dandona, 2002; Haddy et al., 2006; K. K. Wu and and P. Thiagarajan, 1996). Il module le tonus contractile des cellules musculaires lisses (CMLs) vasculaires (CMLVs) en libérant des facteurs pro-contractants tels que l'endothéline (ET-1) et le thromboxane A<sub>2</sub> ou pro-relaxants tels que la prostacycline, la bradykinine et le monoxyde d'azote (NO) (Lerman

and Zeiher, 2005). Les mécanismes précis contrôlant cette homéostasie sont complexes et résultent d'interactions entre le sang, l'endothélium et les CMLs.

- **La tunique moyenne ou média**, comprend essentiellement des CMLs disposées en anneaux et des feuillets d'élastine continus associés aux macromolécules de la matrice extracellulaire (faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes). L'activité du muscle lisse vasculaire est régie par les neurofibres vasomotrices du système nerveux sympathique et par d'autres substances vasoactives d'origine endothéliale. Selon la nature des stimuli, les CMLs peuvent soit se contracter, et induire une vasoconstriction ou se relâcher pour induire une vasodilatation. Ces variations du diamètre des vaisseaux sanguins ont des effets marqués sur la pression sanguine, ce qui souligne le rôle important de la média dans la régulation du flux sanguin.

- **La tunique externe ou adventice** est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et fibres élastiques et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Dans les gros vaisseaux, elle contient des *vasa vasorum* qui sont de très petits vaisseaux sanguins, ayant un rôle nourricier pour l'adventice et pour la partie externe de la média. L'adventice est parcourue de vaisseaux lymphatiques neurofibres dont l'arborisation terminale forme un réseau périvasculaire (Burnstock and Iwayama, 1971). Ces fibres nerveuses agissent directement sur les CMLs de la couche la plus externe de la média puis la transmission de l'excitation se fera de proche en proche grâce aux jonctions communicantes. La densité de l'innervation est inversement corrélée à la taille du vaisseau mais aussi à la résistance du vaisseau. Ainsi, ce sont les petites artérioles pré-capillaires qui sont les plus innervées. L'innervation du muscle lisse vasculaire est essentiellement sympathique. Si la régulation du tonus vasculaire est classiquement décrite pour être médiée par la noradrénaline (NA), d'autres médiateurs assimilés et co-transmetteurs peuvent aussi être impliqués comme le peptide vasoactif intestinal (VIP), l'histamine, la sérotonine, la substance P, les enképhalines, CGRP et enfin le neuropeptide Y (NPY) (Burnstock, 2011).



**Figure 3 : Structure de la paroi vasculaire** (Pérez-Martin et al., 2016).

CE : cellule endothéliale, CML : cellule musculaire lisse, Coll : collagène, Fib : fibroblaste, LE : limitante élastique.

Les différents types de vaisseaux se distinguent par leur longueur, par leur diamètre ainsi que par l'épaisseur et la composition de leur paroi que l'on peut résumer dans le tableau suivant (Tableau 1).

| Types de vaisseaux | Diamètre de la lumière (D)<br>et épaisseur de la paroi (E) | Composition relative |                 |              |               |
|--------------------|------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------|--------------|---------------|
|                    |                                                            | Endothélium          | Tissu élastique | Muscle lisse | Tissu fibreux |
| Artère élastique   | D : 1,5 cm, E : 1 mm                                       | +                    | +++             | ++++         | ++            |
| Artère musculaire  | D : 6 mm, E : 1 mm                                         | +                    | ++              | +++++        | ++++          |
| Artériole          | D : 37 $\mu$ m, E : 6 $\mu$ m                              | +                    | ++              | +++          | +             |
| Capillaire         | D : 7 $\mu$ m, E : 5 $\mu$ m                               | +                    | -               | -            | -             |
| Veinule            | D : 20 $\mu$ m, E : 1 $\mu$ m                              | +                    | -               | +            | ++            |
| Veine              | D : 5 mm, E : 0,5 mm                                       | +                    | +               | +++          | ++++          |

**Tableau 1 : Structure comparative des vaisseaux sanguins d'après** (Marieb, 2005).

(+) indique l'abondance et (-) indique l'absence d'un tissu donné.

### 1.1.3. Organisation du réseau artériel

Selon leur taille et leur fonction, les artères se divisent en trois groupes : les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles.

- **Les artères élastiques ou de conductances** sont les grosses artères à la paroi épaisse situées près du cœur, soit l'aorte et ses principales ramifications. Elles possèdent le plus grand

diamètre (entre 1 et 2,5 cm chez l'homme) et la plus grande élasticité grâce à leur composition riche en élastine. Cette dernière leur permet de supporter et compenser les grandes fluctuations de pression entre la systole et la diastole. Bien qu'elles contiennent une petite quantité de muscle lisse, les artères de conductances ont un rôle peu actif dans la vasoconstriction. Leur paroi se dilate et se resserre passivement selon le volume sanguin éjecté permettant un écoulement presque continu du sang (Marieb, 2005).

- **Les artères musculaires ou de résistances** naissent à partir des artères élastiques. Elles possèdent un plus petit diamètre (entre 0,3 mm et 1 cm) responsable de l'apparition d'une forte résistance à l'écoulement du sang. Leur tunique moyenne dépasse en épaisseur celle des autres vaisseaux (Tableau 1). En outre, elles contiennent plus de muscle lisse et moins de tissu élastique ; par conséquent elles sont dotées d'un tonus contractile plus important que les artères de conductances (Marieb, 2005).

## **1.2. Physiologie et rôle du muscle lisse vasculaire**

### **1.2.1. Description du muscle lisse vasculaire**

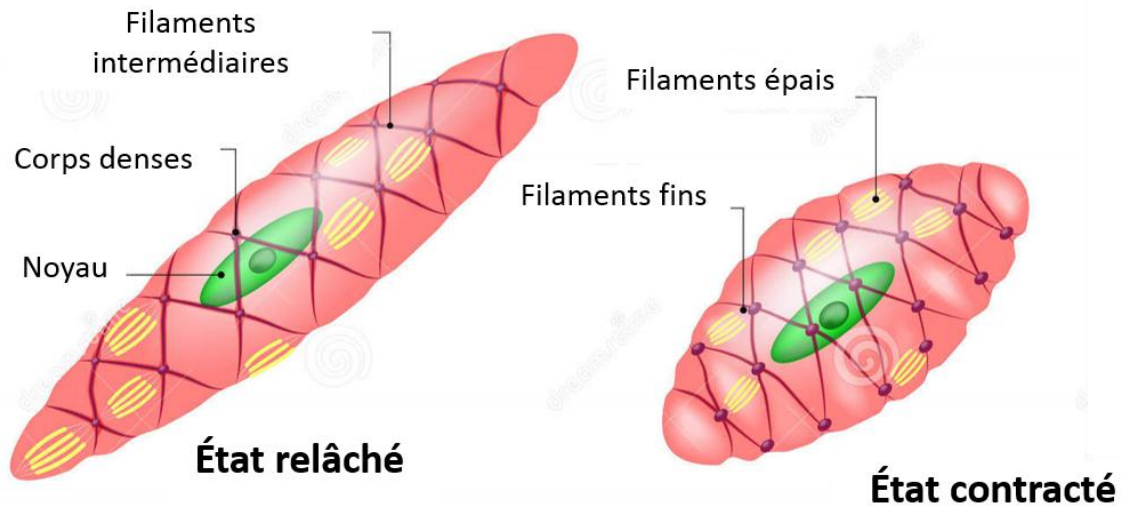
Il existe trois types de tissus musculaires chez l'homme : les muscles squelettiques (MSs), cardiaques (MCs) et lisses (MLs). La plus part des muscles squelettiques s'insèrent sur des pièces osseuses du squelette et ont un rôle dans le contrôle du mouvement. Le muscle cardiaque se trouve uniquement dans le cœur, il est appelé myocarde et permet la contraction cardiaque.

Le ML se trouve dans la paroi des organes creux et tubulaires, où sa contraction change la forme de l'organe. 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. L'organisation du ML diffère en quelque point de celle du MS et peut être résumé dans les points suivants (Silverthorn et al., 2007) :

- La taille du ML est plus petite que celle du MS. Les cellules qui le composent sont des CML qui ont une forme de fuseaux à un seul noyau, ce qui les oppose aux grandes fibres multinucléées des MS.

- Les MLs ont des filaments d'actine et de myosine plus longs que les MSs et l'isoforme de la myosine dans le ML est différente de celle du MS. L'activité ATPasique de la myosine du ML est plus lente, allongeant la phase de contraction. De plus, la myosine dans le ML possède une petite chaîne qui a un rôle régulateur (décrite dans le prochain paragraphe, 2.2). L'actine est plus abondante dans le ML et s'associe à la tropomyosine comme dans le MS. Cependant le ML ne possède pas de troponine.

- Les filaments contractiles du ML ne sont pas disposés en sarcomère. L'actine et la myosine sont disposées en longs fuseaux obliques qui s'étendent en diagonale à la périphérie de la cellule. Cette disposition oblique des éléments contractiles fait que la fibre musculaire devient globulaire lors de la contraction (Figure 4), au lieu de se raccourcir comme dans le MS.



**Figure 4 : Représentation schématique d'une CML dans un état relâché et dans un état contracté** (Marieb, 2005)

La CML a une forme allongée fusiforme mononuclée lorsqu'elle est relâchée et devient globulaire lorsqu'elle se contracte. Les filaments intermédiaires, les filaments épais et fins appartiennent au cytosquelette. Les corps denses servent de point d'ancrage aux filaments fins.

### 1.2.2. Description et fonction de la CML

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

Leur cytosquelette est composé de myofilament (filaments épais et fins), de filaments intermédiaires et de microtubules (Gabbiani et al., 1981). Les filaments intermédiaires sont fixés à intervalles réguliers à des structures appelées corps denses (Figure 4). Ces derniers servent aussi de point d'ancrage aux filaments fins. Le réseau formé par les filaments intermédiaires et les corps denses constitue un cytosquelette intracellulaire résistant, qui dirige la traction exercée par les filaments épais fins.

Les filaments intermédiaires, principalement composés de vimentine et desmine, assurent le maintien de l'organisation architecturale du système des myofilaments. Les microtubules, formés de protofilament de tubuline, interviennent dans le transport des vésicules intracellulaires. Enfin, les myofilaments constituent l'appareil contractile qui assure la fonction contractile des CMLs. Ils sont représentés par les filaments fins et épais (Gabbiani et al., 1981).

- **Les filaments épais de myosine** : il s'agit d'un complexe hétérohexamérique non covalent constitué d'une paire de chaînes lourdes de 200-250 kDa, associées au niveau de leur tête globulaire à deux paires de chaînes légères (*Myosin light chain*, MLC) : la MLC20 de poids moléculaire 20 kDa, phosphorylable, dite chaîne régulatrice, et la MLC17 de poids moléculaire 17 kDa, dite chaîne « essentielle ». Les chaînes lourdes de la tête globulaire comportent deux sites nécessaires à sa fonction motrice : celui de l'hydrolyse de l'ATP (fonction ATPase) et celui de l'interaction avec l'actine.

- **Les filaments fins** : ce sont des polymères formés de monomère d'actine globulaire. Au niveau de la CML, 4 isoforme d'actine sont exprimés : l' $\alpha$ -actine du muscle lisse ( *$\alpha$ -smooth muscle-actin*), la  $\gamma$ -actine du muscle lisse ( *$\gamma$ -smooth muscle-actin*), la  $\beta$ -actine non-musculaire ( *$\beta$ -non muscle-actin*) et la  $\gamma$ -actine non musculaire ( *$\gamma$ - non muscle-actine*). La forme  $\alpha$  est prédominante dans les CMLVs. Elle est associée à la tropomyosine, la caldesmone et la calponine. Les filaments fins sont en revanche totalement dépourvu de troponines I, T et C, constituant essentiel du filament fin du sarcomère dans le MS. Les troponines ont pour rôle de régler d'une façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  le couplage contraction-relaxation dans le MS et MC.

Les CMLVs ont la capacité de maintenir une contraction permanente dite tonique responsable du tonus vasculaire, tandis que d'autre type de CML comme celle de la vessie par exemple se contracte de façon phasique, c'est-à-dire, en alternant plusieurs cycles de contraction-relaxation. De plus, la contraction des CMLs est caractérisée par une faible consommation énergétique (300 à 500 fois moins d'énergie qu'une cellule musculaire squelettique). Les CMLs dispose d'une innervation spécifique. En effet, contrairement au MS où toutes les cellules musculaires sont innervées sans être connectées entre elles, les CMLs sont faiblement innervées. La transmission du signal se fait grâce à des jonctions communicantes qui permettent un fort couplage électrique et fonctionnel entre elles par le passage de molécules de bas poids moléculaire telles que le  $\text{Ca}^{2+}$  et le 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPC).

### 1.2.3 Mécanisme moléculaire de contraction de la CML

Un filament épais de myosine peut être en contact avec six filaments fins d'actine. 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. 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 le filament de myosine ce qui leur empêche tout glissement en arrière (Silverthorn et al., 2007).

La force contractile des fibres musculaires lisses est liée à la phosphorylation spécifique et réversible de la MLC20 sur la sérine 19 (Ikebe et al., 1987), elle-même régulée par deux enzymes clés : la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLC Kinase : MLCK) et la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC Phosphatase : MLCP) (Figure 5).

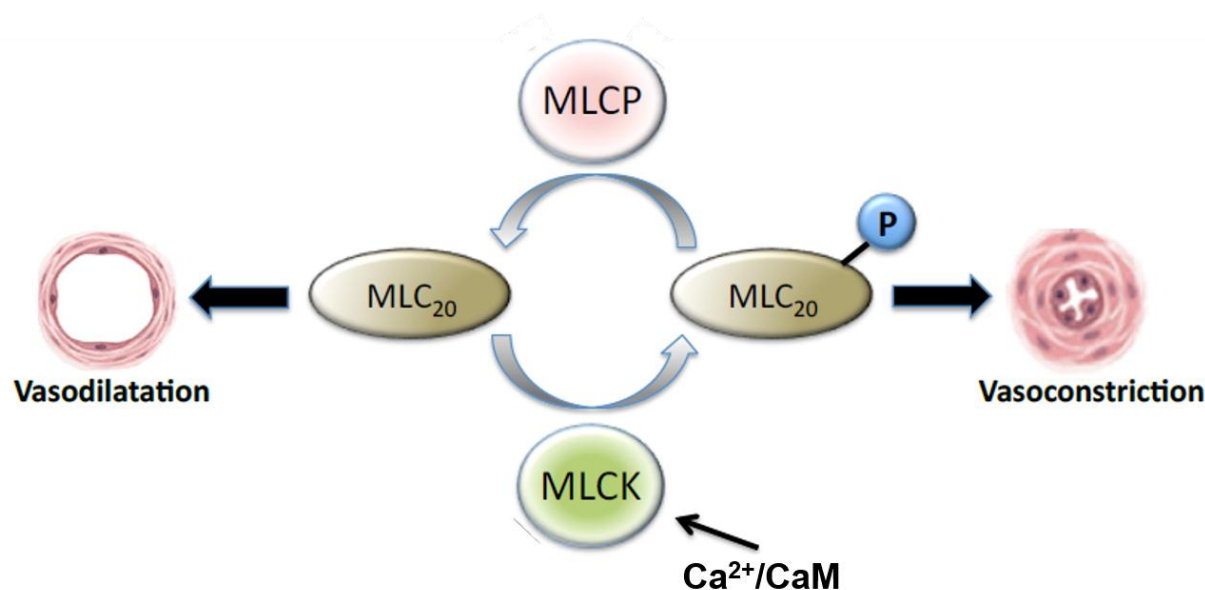
- **La kinase de la chaîne légère de la myosine (MLC Kinase : MLCK)** est responsable du changement de conformation de la myosine. En effet, sa phosphorylation sur la sérine 19 (Ikebe et al., 1987) permet son passage à une conformation allongée, facilitant la liaison à l'actine (Horowitz et al., 1996).

- **La phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC Phosphatase : MLCP)** est responsable de la rupture de l'interaction actine-myosine grâce à son activité déphosphorylante. L'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine alimente le cycle des ponts d'union entre la myosine et l'actine nécessaire à la contraction (Horowitz et al., 1996).

L'activité de la MLCK est corrélée positivement à la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En effet, l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , permet la liaison de la calmoduline (CaM) au  $\text{Ca}^{2+}$  pour former un complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  se liant à une molécule de CaM). Ce dernier va ensuite interagir avec la MLCK, pour l'activer. La kinase activée catalyse le transfert aux têtes de myosine de groupement phosphate provenant de l'ATP. Cette phosphorylation permet l'interaction des têtes de myosine avec l'actine et le raccourcissement de la fibre musculaire. La diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permet une vasodilatation (Figure 5).

Parallèlement à ce mécanisme de contraction dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ , il existe un second mécanisme, appelé sensibilisation de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$ , qui permet de maintenir la MLC20 dans un état phosphorylé alors que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reste inchangée.





**Figure 5 : Régulation de la phosphorylation de la MLC<sub>20</sub> par la MLCP et la MLCK.**

Ca<sup>2+</sup>/CaM : complexe Ca<sup>2+</sup>- calmoduline, MLC<sub>20</sub> : chaîne légère de la myosine, MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine, MLCP : phosphatase de la chaîne légère de la myosine, P indique une phosphorylation.

La MLCK activée par le complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM, phosphoryle la tête globulaire de la myosine représentée par la MLC<sub>20</sub>. Ceci permet l'interaction avec l'actine pour induire une vasoconstriction. L'activité déphosphorylante de la MLCP permet une rupture des ponts actine-myosine et induit une vasodilatation.

## 1.2.4. Voies de contraction de la CML

### 1.2.4.1. Contraction dépendante du Ca<sup>2+</sup>

En absence de tout stimulus, la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans la CML est très faible (environ 0,1 μM), alors qu'elle est beaucoup plus importante dans le réticulum sarcoplasmique (RS) (10 à 15 mM) (Chapman and Tunstall, 1987) et le milieu extracellulaire (1 à 2 mM) (Marín et al., 1998).

Une augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique est le signal qui déclenche la contraction. Le Ca<sup>2+</sup> entre dans la cellule depuis le milieu extracellulaire *via* les canaux calciques de type L (LTCC pour *L-type calcium channel*) et est libéré par les réservoirs intracellulaires représentés par le RS. Cependant comme les réserves de Ca<sup>2+</sup> dans le ML sont limitées, la contraction soutenue dépend de l'influx continu de Ca<sup>2+</sup> depuis le milieu extracellulaire. Le RS contient deux type de récepteurs : l'inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP3R) et les récepteurs à la ryanodine (RyR) (McCarron et al., 2006). L'IP3R est assimilé à la réponse contractile alors que le RyR est plutôt assimilé à une réponse relaxante. En effet, l'ouverture des IP3R libère une quantité massive de Ca<sup>2+</sup> sous forme d'une vague calcique ou *calcium wave* tandis que la libération de Ca<sup>2+</sup> par les RyR est plus localisée et transitoire qu'on appelle *sparks* calciques ou étincelles calciques

(Nelson et al., 1995) . Elle est destinée à activer les canaux potassiques de grande conductance appelés BK<sub>Ca</sub> pour *Big-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated channel*, cette partie sera abordée dans le chapitre 3 (Brayden and Nelson, 1992).

De nombreuses protéines membranaires mais aussi intracellulaires assurent le maintien de l'homéostasie calcique dans la CML. On retrouve :

- la pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase (*Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase* : PMCA) expulse un ion Ca<sup>2+</sup> contre l'entrée de 2 ions H<sup>+</sup> (Carafoli, 1992).
- l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> fait sortir un ion Ca<sup>2+</sup> contre l'entrée de 3 ions Na<sup>+</sup> dans la cellule (Eisner and Lederer, 1985).
- Le RS joue un rôle primordial dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Cette fonction est assurée par une protéine largement exprimée à ce niveau, la Ca<sup>2+</sup>-ATPase du RS (*Sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase* : SERCA).

La contraction dépendante du Ca<sup>2+</sup> regroupe un ensemble de processus intracellulaire dont l'activation dépend directement de la nature du stimulus (Figure 6). Ce dernier peut être soit **d'origine pharmacologique (initiation pharmaco-mécanique)**, résultant de la liaison d'un agoniste à son récepteur situé à la membrane de la CML ; soit d'origine **électrique (initiation électro-mécanique)**, faisant suite à une augmentation de potentiel de membrane à des valeurs positives, supérieur au potentiel de repos. Dans tous les cas, ces deux processus agissent en synergie pour augmenter la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> à des valeurs de l'ordre du micromolaire, nécessaire à la contraction de la CMLV.

#### 1.2.4.1.1. Contraction suite à une initiation pharmaco-mécanique

De nombreuses substances vasoactives endogènes sont impliquées dans le mécanisme de contraction de la CMLV. Elles peuvent provenir soit du système sympathique (NA et adrénaline), soit de l'endothélium (ET-1) ou encore des tissus environnants (angiotensine II (AT II)). Ces agonistes endogènes se lient à des récepteurs de type RCPG couplés à une sous unité  $\alpha$  de type G<sub>q/11</sub> permettant la transduction du signal au niveau intracellulaire pour aboutir à l'augmentation [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> . En effet, les protéines G<sub>q/11</sub> vont stimuler l'activité enzymatique de la phospholipase C (PLC), spécifique du phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP2) de la membrane lipidique dont l'hydrolyse se traduit par la formation de deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5 tri-phosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). La liaison de l'IP3 sur son récepteur spécifique (IP3R) à la membrane du RS produit une libération de Ca<sup>2+</sup> des stocks du RS vers le cytosol (Hirose et al., 1999). Le Ca<sup>2+</sup> libre peut se lier à la CaM pour déclencher le processus de contraction, mais également se lier à un autre type de récepteur : les récepteurs à

la ryanodine (RyR). Leur activation entraîne l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol. Ce mécanisme appelé " *$\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release*" (CICR), a une plus grande envergure dans le MC que dans le ML. La colocalisation des IP3R et des RyR contribuerait à l'amplification du CICR. (Janiak et al., 2001). L'activité des IP3R est finement régulée par la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , qui lorsqu'elle est faible, favorise l'ouverture des IP3R. À l'opposé, lorsqu'elle est élevée, elle stimule plutôt la fermeture des IP3R (Mak et al., 1998).

#### **1.2.4.1.2. Contraction suite à une initiation électro-mécanique**

En fonction des territoires vasculaires, le potentiel de membrane des CMLs varie entre -50 mV et -45 mV dans les cellules possédant une activité électrique spontanée (veine porte), -60 mV et -55 mV dans les grosses artères et les veines capacitives et -70 mV et -65 mV dans les artères et les veines de résistance (Hirst and Edwards, 1989). Ces valeurs, plus positives que le potentiel d'équilibre pour les ions  $\text{K}^+$  (-90 mV, -85 mV) sont dues à une concentration intracellulaire en ions  $\text{Cl}^-$  relativement importante amenant le potentiel d'équilibre pour cet anion entre -20 et -30 mV.

La modulation du potentiel de membrane est un élément important de la régulation du tonus vasculaire : une dépolarisation de 3 mV augmente de deux fois l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux calciques dépendants du potentiel : LTCC, produisant respectivement une vasoconstriction (Nelson and Quayle, 1995a). Deux types de canaux ioniques interviennent dans la modulation du potentiel de membrane dans les CMLVs : certains canaux  $\text{K}^+$  et des canaux  $\text{Cl}^-$ , ouverts par l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytoplasmique. L'activation de ces canaux  $\text{Cl}^-$  déplace le potentiel de membrane dans le sens d'une dépolarisation et l'ouverture des canaux  $\text{K}^+$  le déplace dans le sens d'une hyperpolarisation.

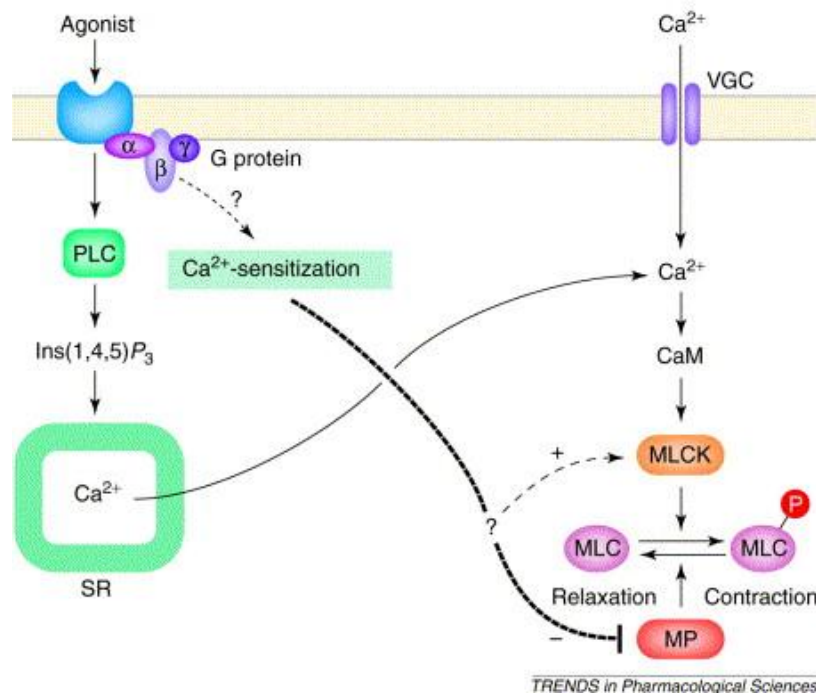
La CML contient de nombreux canaux activés lors de l'étirement, qui s'ouvrent en réponse à une augmentation de la pression intraluminale, en absence de tout stimulus pharmacologique. Comme la contraction dans ce cas-là est liée à une propriété de la fibre musculaire elle-même, on parle de contraction myogénique (Bayliss, 1902). Le changement de la pression intraluminale est suivi d'une dépolarisation de la membrane des CMLs, responsable d'une mobilisation calcique intracellulaire qui activera les protéines contractile pour induire une vasoconstriction.

C'est en 1902, que 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 myogénique (Bayliss, 1902). En 1949, Folkow a montré que ce tonus vasculaire est un mécanisme non neuronal puisqu'il persiste au niveau des vaisseaux dénervés et qu'en plus la

réponse myogénique est d'autant plus élevée que le diamètre des vaisseaux est petit. En effet, au niveau des petites artérioles pré-capillaires, le tonus myogénique constitue un mécanisme local d'autorégulation du débit sanguin lors d'une augmentation ou d'une baisse soudaine de la pression artérielle.

Différents types de canaux sont décrits pour participer à l'initiation de la réponse myogénique, nous nous intéresserons aux canaux calciques dépendants du potentiel et nous aborderons les autres dans la partie 4 du chapitre 1.4 de l'introduction.

Les canaux calciques dépendants du potentiel représentent la voie principale d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les CMLV. La quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre dans la cellule par cette voie est essentiellement déterminée par le potentiel de membrane (Shmigol et al., 1998). La CMLV exprime deux types de canaux calciques : l'isoforme  $\text{Ca}_v1.2$  des canaux calciques de type L (LTCC : *L-type calcium channel* ou canaux  $\text{Ca}_v1.$ ) et les canaux calciques de type T ( $\text{Ca}_v3$ , "*Transient*"). Ce sont les principaux acteurs de la réponse myogénique. Ils sont formés de 5 sous-unités. La sous-unité  $\alpha_1$  forme le pore du canal et renferme le site sensible à la dépolarisation du potentiel de membrane. Elle s'associe à 4 autres sous-unités régulatrices  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et  $\delta$ . Les  $\text{Ca}_v1.2$  sont inhibés par les dihydropyridines (nifedipine, isradipine, nicardipine) par action sur la sous-unité  $\alpha_1$ . Les  $\text{Ca}_v1.2$  sont directement impliqués dans l'effet vasoconstricteur des substances vasoactives tel que l'AT II et l'ET-1. En effet, il a été rapporté que la liaison de ces agonistes à leurs RCPG couplé à une  $G_q\alpha$  induit une dépolarisation et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Ce qui permettait la potentialisation de l'ouverture de ces canaux calciques (Ghosh et al., 2017). De plus, l'étude de Nieves-Cintrón (Nieves-Cintrón et al., 2008) rapporte que l'ablation génétique de la PKC entraînait une diminution de l'activité des  $\text{Ca}_v1.2$  et par conséquent le développement de l'hypertension artérielle induite par l'AT II.



**Figure 6 : Représentation schématique du mécanisme de contraction dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$**  (Fukata et al., 2001).

CaM : complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline, MLC : chaînes légères de myosine, MLCK : kinase des chaînes légères de myosin, MP : phosphatase de chaînes légères de myosine, PLC : phospholipase C, SR : réticulum sarcoplasmique, VGC : canaux calciques de types L.

La fixation d'un agoniste comme la noradrénaline sur son RCPG permet la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  de RS, et par dépolarisation membranaire un influx calcique *via* les LTCC. L'augmentation des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  permet la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM qui active la MLCK. Cette dernière fait basculer l'équilibre vers la forme phosphorylée de la MLC20 et induit une contraction.

#### 1.2.4.2. Mécanisme de contraction par sensibilisation au $\text{Ca}^{2+}$

Le  $\text{Ca}^{2+}$  constitue un important régulateur de la contraction grâce à son rôle d'activateur de la MLCK. Cependant, la mesure simultanée de la contraction et de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a révélé qu'il n'y avait pas toujours parallélisme entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , le degré de phosphorylation de la MLC20 et la contraction (Kitazawa et al., 2003). En effet, en présence d'agoniste vasoconstricteur, la phosphorylation et la contraction sont parfois supérieures à ce qu'elles devraient être si elles dépendaient uniquement de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kitazawa et al., 2003). Ainsi, il a été conclu l'existence d'un autre mécanisme majeur de régulation de la contraction, permettant d'augmenter le niveau de phosphorylation de la MLC20 sans variation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ce mécanisme majeur est appelé sensibilisation de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$ . Il implique l'inhibition de la MLCP (Somlyo and Somlyo, 2003). D'autre part, la diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  par activation de la MLCP promeut une réponse vasodilatatrice.

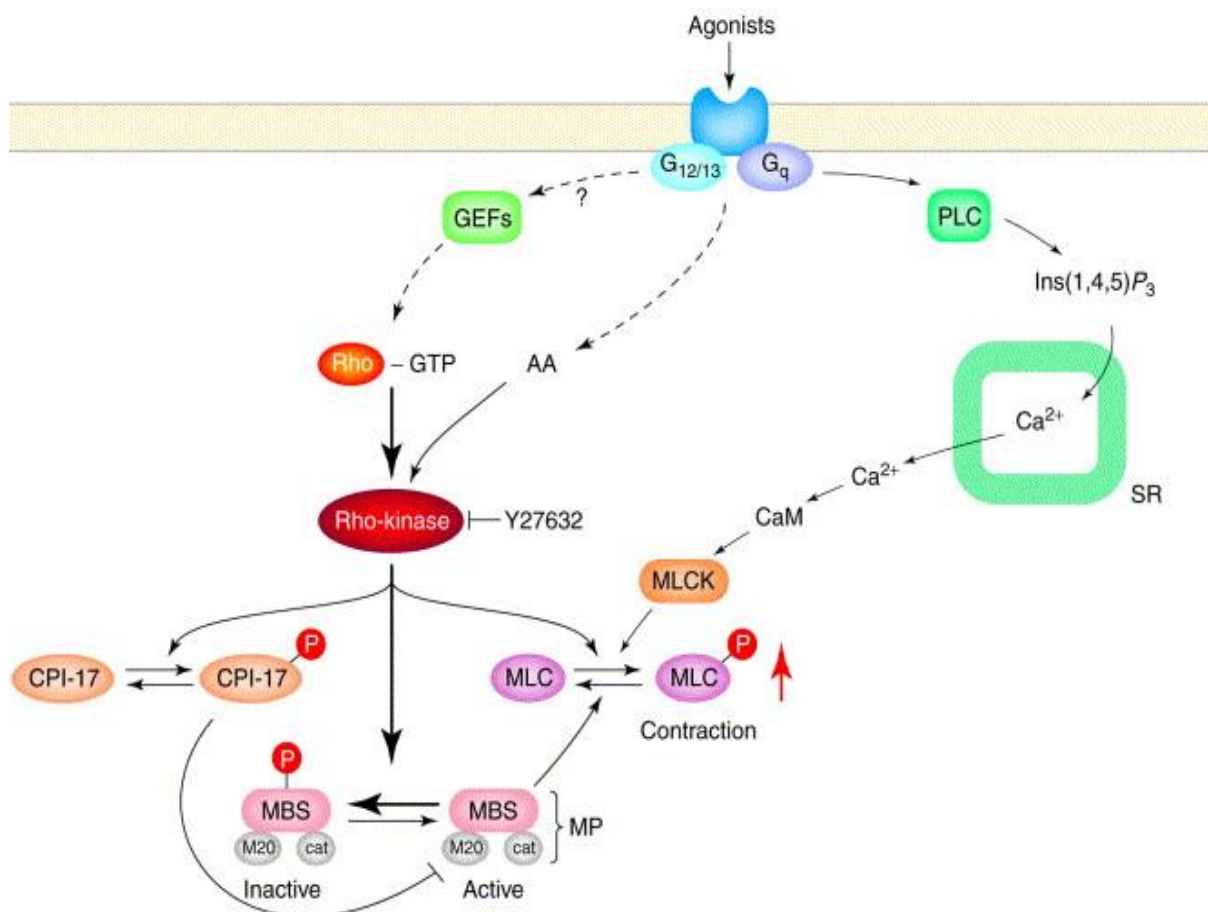
La MLCP est constituée de 3 sous-unités :

- Une sous-unité régulatrice MYPT pour *myosin phosphatase target* qui permet l'ancrage sur la MLC. C'est l'isoforme 1 qu'on retrouve au niveau vasculaire.
- Une sous-unité catalytique PP1c de 37 kDa apparentée à la famille des sérine/thréonine phosphatases.
- Une 3<sup>ème</sup> sous-unité de 20 kDa dont la fonction est inconnue.

#### **1.2.4.2.1. Voies d'inhibition de l'activité de la MLCP (sensibilisation de l'appareil contractile au $Ca^{2+}$ )**

L'inhibition de l'activité de la MLCP se fait (Figure 7) :

- **Soit par action de la Rho Kinase (RhoK) sur MYPT1 ou sur la MLC20** : RhoA est une petite protéine G qui appartient à la superfamille Ras. Au repos, RhoA est liée à une au GDP (guanine diphosphate). Sous l'action d'agonistes vasoconstricteurs comme la thrombine, l'AT II, l'ET-1 et la NA (Seasholtz et al., 1999), la protéine RhoA passe à l'état actif grâce au facteur d'échange GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), qui catalyse la substitution du GTP au GDP. RhoA active par la suite son effecteur RhoK, qui est une sérine-thréonine kinase qui va phosphoryler la sous-unité MYPT1. Elle est aussi capable de phosphoryler directement la MLC20 sur le même site que la MLCK (sérine 19) (Loirand et al., 2006).
- **Soit par action de la PKC sur son substrat, le CPI-17 et de l'acide arachidonique (AA) sur RhoK** : l'AA est capable d'activer directement RhoK, indépendamment de son interaction avec Rho (Fu et al., 1998). Par ailleurs, il peut activer la PKC (Gong et al., 1992) qui en phosphorylant le CPI-17, inhibe l'activité de la MLCP (Kitazawa et al., 2003). CPI-17 peut aussi être phosphorylé par RhoK.



TRENDS in Pharmacological Sciences

**Figure 7 : Représentation schématique des voies de sensibilisations de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$  (voies d'inhibition de l'activité de la MLCP) (Fukata et al., 2001).**

AA : acide arachidonique, GEF : facteur d'échange du GTP en GDP, MBS : sous-unité MYPT1, MLC : MLC20, chaînes légères de myosine, MP : phosphatase des chaînes légères de la myosine.

La liaison d'un agoniste vasoconstricteur sur son récepteur active la protéine Rho et stimule la production de l'AA. Ces derniers agissent *via* leur effecteur, la protéine RhoK pour inhiber l'activité de la MLCP et stimuler la phosphorylation de la MLC20.

#### 1.2.4.2.2. Voies d'activation de la MLCP (désensibilisation de l'appareil contractile au $\text{Ca}^{2+}$ )

Elles impliquent des seconds messagers vasorelaxants : l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et le GMPc (guanosine monophosphate cyclique) qui activent des protéines effectrices la PKA (protéine kinase A) et la PKG (protéine kinase G) respectivement. Ces dernières vont réduire la phosphorylation du MYPT1 par un mécanisme d'exclusion de phosphorylation (Wu et al., 1998). L'AMPc peut aussi exercer un effet inhibiteur sur l'activité de la MLCP de manière indépendante de la PKA (Wooldridge et al., 2004). L'AMPc peut ainsi activer un autre effecteur appelé Epac pour *exchange protein directly activated by cAMP*. Il

constitue facteur d'échange du GTP pour Rap1. Cette dernière agirait comme bloqueur de la voie RhoA qui active RhoK (Zieba et al., 2011).

La désensibilisation de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$  peut aussi mettre en jeu la MLCK. En effet, son activité peut être inhibée par phosphorylation soit par la protéine kinase dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  de type II (CaMKII) (Rokolya and Singer, 2000). Soit par la PKA (Hathaway et al., 1985).

### **1.3. Effecteurs de la relaxation vasculaire**

Dans la CMLVs, diverses protéines intracellulaires contribuent à la relaxation du MLV. Elles agissent sur trois niveaux distincts : la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , le potentiel de membrane et l'état de phosphorylation de la MLC20. En effet, trois mécanismes concourent à la relaxation du MLV : la diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , l'hyperpolarisation du potentiel de membrane et la diminution de la phosphorylation de la MLC20.

#### **1.3.1. Diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$**

L'activation de la protéine SERCA située dans le RS constitue une des principales voies de régulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Elle joue un rôle crucial dans la cinétique de relaxation du MLV et constitue le déterminant majeur de la charge du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS.

Son activation permet le repompage actif du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, libéré lors de la contraction par les IP3R du RS ou influant du milieu extracellulaire *via* les LTCC. A chaque cycle, la SERCA hydrolyse l'ATP en ADP pour permettre le transport de deux ions de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lumière du RS. Une baisse des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  favorise la relaxation des CMLVs.

Les études de clonages ont révélées l'existence de trois gènes codant pour la SERCA nommés *SERCA1*, *SERCA2* et *SERCA3* (Brandl et al., 1987; Burk et al., 1989). Deux variants ont été identifiés pour chacun des gènes *SERCA1* et *SERCA2* : *SERCA1a* et *SERCA2B*; *SERCA2a* et *SERCA2b* et 6 variants pour *SERCA3* : *SERCA3a*- *SERCA3f*. Au niveau vasculaire, les CMLVs expriment les variants *SERCA2a* et *SERCA2b* alors que les CE expriment l'isoforme *SERCA3* et le variant *SERCA2b* (Wu et al., 2001).

La SERCA est une protéine transmembranaire de 110 kDa. Son activité est régulée dans le MLV par des petites protéines : le phospholamban (PLB) dans tous les types cellulaires et la sarcolipine dans le muscle cardiaque et squelettique (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007).

La régulation de la SERCA par le PLB est maintenant bien élucidée alors que le rôle de la sarcolipine est mal connu. Le PLB est un homopentamère de 52 acides aminés. A l'état non



phosphorylé, le PLB exerce un effet inhibiteur sur l'activité de la SERCA. Une stimulation par les agents éleveurs de la concentration d'AMPc ou GMPc, active les protéines effectrices de ces seconds messagers : PKA et PKG respectivement. Ces dernières vont phosphoryler le PLB sur la sérine 16, ce qui entraîne une levée d'inhibition sur l'activité de la SERCA (Cornwell et al., 1991; Lincoln and Cornwell, 1991). Le PLB peut aussi être phosphorylé sur la thréonine 17 par la CAMKII (Zhao et al., 2004).

### 1.3.2. Hyperpolarisation du potentiel de membrane

Dans la CMLs plusieurs familles de canaux potassiques jouent un rôle primordial dans le maintien du potentiel membranaire au repos (Jackson, 2000). L'activation de ces canaux entraîne un efflux de  $K^+$  qui hyperpolarise la membrane entraînant la fermeture des canaux LTCC. Ceci limite l'influx calcique vers le cytosol *via* les LTCC et induit une vasorelaxation.

La CMLV exprime quatre principaux types de canaux potassiques :

- Les canaux potassiques dépendant du potentiel :  $K_v$  (*Voltage-gated  $K^+$  channels*)
- Les canaux potassiques activés par le  $Ca^{2+}$  et la dépolarisation :  $BK_{Ca}$  (*Large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels*).
- Les canaux potassiques sensibles à l'ATP :  $K_{ATP}$  (*ATP-sensitive  $K^+$  channels*)
- Les canaux potassiques rectifiants entrants :  $K_{IR}$  (*Inward Rectifier  $K^+$  Channels*)

#### 1.3.2.1. Les $K_v$

Ils sont très exprimés dans les CMLVs. Ils s'activent en réponse à une dépolarisation du potentiel de membrane permettant l'efflux de  $K^+$  et un retour à l'état de repos.

Ils sont composés de l'association de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est formée de 6 segments transmembranaires S1-S6 et c'est le domaine S4 qui porte la sensibilité au voltage. Les domaines N et C terminaux sont intracellulaires. La sous-unité  $\alpha$  s'associe en homotetramère de telle sorte que les segments S5-S6 forment le pore du canal (Cox, 2005).

La sous-unité  $\beta$  est intracellulaire et interagit avec le domaine N-terminal de la sous-unité  $\alpha$  *via* son domaine C-terminal (Cox, 2005).

Plus de 70 gènes codent pour la famille des  $K_v$  avec de nombreux variants d'épissage. Seules quatre familles sont exprimés dans les CMLs :  $K_v$  1-4.

Ils jouent un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, une injection de 4-aminopyridine, inhibiteur des  $K_v$  augmente la pression artérielle et les résistances périphériques vasculaires (Berg, 2003). De plus, dans des segments d'artères isolées, l'utilisation de cet

inhibiteur pharmacologique entraîne une vasoconstriction. A l'échelle cellulaire, l'utilisation d'un autre inhibiteur sélectif : la correolide entraîne une dépolarisation du potentiel de membrane mesurée par patch clamp (Albarwani et al., 2003).

L'activité des  $K_v$  peut être modulée par différentes kinases : PKA, PKG, PKC (Jonas and Kaczmarek, 1996). La phosphorylation par la PKC semble être inhibitrice (Clément-Chomienne et al., 1996; Hayabuchi et al., 2001) alors que celle des autres kinases est activatrice.

Les  $K_v$  jouent un rôle important dans l'effet vasorelaxant de nombreuses substances endogènes ou exogènes. Une stimulation  $\beta$ -adrénergique ou l'utilisation de forskoline est décrite pour augmenter le courant des  $K_v$  dans les CMLVs d'artère cérébrale de rat via un mécanisme impliquant la voie AMPc/PKA (Aiello et al., 1995, 1998). D'autres études rapportent une activation des  $K_v$  par la voie GMPc/PKG en présence de donneurs de NO et peptides natriurétiques (Sathishkumar et al., 2005; Tanaka et al., 2006).

### **1.3.2.2. Les $K_{ATP}$**

Ils sont constitués par l'association de quatre sous-unités Kir6 (*inward rectifier channel*) formant le pore du canal, associées à quatre sous-unités SUR (Sulfonylurea receptores) régulatrices (Campbell et al., 2003).

La sous-unité Kir6 est codée par deux gènes : *KCNJ8* pour Kir6.1 et *KCNJ11* pour Kir 6.2 (Wei-Wei et al., 2012). De même pour la sous-unité SUR : *ABCC8* pour SUR1 et *ABCC9* pour SUR2A et SUR2B. L'isoforme majeur au niveau vasculaire est composé de Kir6.1/SUR2B (Wei-Wei et al., 2012).

La sous-unité Kir6 est constituée de deux hélices transmembranaires M1 et M2 qui forme le pore du canal. La sous-unité SUR contient 3 domaines transmembranaires : TMD1, TMD2 et TMD0. TMD1 et TMD2 contiennent 6 hélices transmembranaires alors que TMD0 n'en contient que 5. Les domaines TMDs s'associent par des boucles intracellulaires qui portent des domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2 : *Nucleotide Binding Domain*) (Campbell et al., 2003).

L'activité des  $K_{ATP}$  est inhibée par l'ATP ce qui souligne leur rôle dans diverses conditions physiopathologiques associées qui causeraient la diminution de production d'ATP par la mitochondrie, tel que l'hypoxie (Daut et al., 1990), l'ischémie (Kanatsuka et al., 1992), l'acidose (Ishizaka et al., 1999) ; principalement dans les artères cérébrales et coronaires. L'activité des  $K_{ATP}$  peut aussi être modulée par des kinases. La phosphorylation par la PKC est inhibitrice, elle est mise en jeu en présence d'agents vasoconstricteurs comme l'ET-1 (Miyoshi et al., 1992) et l'AT II dans les CMLs d'artère coronaire porcine (Miyoshi and Nakaya, 1991).

La voie relaxante de l'AMPc semble aussi impliquée l'activation des  $K_{ATP}$  via un mécanisme dépendant de la PKA (Porter et al., 1998; Quayle et al., 1997) et leur inhibition via un mécanisme dépendant d'Epac (Purves et al., 2009). Trois sites de phosphorylation par la PKA ont été identifiés : la sérine 385 sur la sous-unité Kir6.1, la thréonine 633 et la sérine 1465 sur la sous-unité SUR2B (Quinn et al., 2004). Le rôle de la voie relaxante GMPc/PKG dans la régulation de l'activité des  $K_{ATP}$  n'est pas clairement établi cependant, il a été rapporté que dans des CMLs en culture, l'utilisation de donneurs de NO (Miyoshi et al., 1994) ou de l'ANP (Kubo et al., 1994) augmenterait l'activité des  $K_{ATP}$ .

### 1.3.2.3. Les $K_{ir}$

Ils sont décrits pour réguler le potentiel de membrane dans plusieurs types d'artères de résistance et pour contribuer à la réponse relaxante induite par l'augmentation modérée des concentrations extracellulaires de  $K^+$  (10-15 mM) (Standen and Quayle, 1998).

Ce sont des tétramères de sous-unités contenant chacune deux domaines transmembranaires. Ils sont codés par le gène *Kir* (Standen and Quayle, 1998). L'isoforme Kir2 prédomine dans le système vasculaire, particulièrement dans les artères de résistance (Brayden and Nelson, 1992; Standen and Quayle, 1998). Comme leur nom l'indique (*ir* = *inward rectifier*, a rectification entrante) le passage du  $K^+$  est favorisé dans le sens d'un influx, possible à des potentiels inférieurs au potentiel d'équilibre  $E_K$  (hyperpolarisation).

Leur activité est inhibée par le  $Ba^{2+}$  et peut être modulée par la PKC et la PKA. La phosphorylation par la PKC est médiée par des agents vasoconstricteurs (AT II, ET-1) (Kim et al., 2005; Park et al., 2008). Certains agents vasodilatateurs sont décrits pour impliquer les Kir, comme l'adénosine et les prostacycline (Aiello et al., 1995; Park et al., 2008). Ces derniers stimulent l'activité des Kir par un mécanisme dépendant de la PKA. L'implication des Kir dans la voie relaxante du GMPc n'a pas été décrite.

### 1.3.2.4. Les $BK_{Ca}$

Ces canaux sont présents dans tous les types de CMLVs. Ils jouent un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire. Ce sont des canaux potassiques qui présentent la particularité d'être activés par le  $Ca^{2+}$  et la dépolarisation (Hu and Zhang, 2012). Ils seront décrits dans le chapitre 3 de l'introduction.

### **1.3.2. Diminution de la phosphorylation de la MLC20**

Il s'agit d'un mécanisme qui met en jeu la MLCK et la MLCP. Il a été décrit dans la partie 4.2.2 du chapitre 1.2 dans l'introduction.

## **1.4. Mécanisme de régulation de la vasomotricité**

Au repos, le ML vasculaire existe sous un état de tension permanent qu'on appelle tonus musculaire, indispensable pour répondre aux stimuli par différents signaux chimiques. Ces derniers peuvent être vasoconstricteurs ou bien vasodilatateurs. Ils sont représentés par des molécules vasoactives, libérées soit localement par les fibres nerveuses du système nerveux autonome ou l'endothélium, soit à distance, puis transportées par le sang vers les CMLs.

### **1.4.1. Régulation nerveuse**

#### **1.4.1.1. Régulation par le système sympathique**

La NA libérée par les fibres post-ganglionnaires sympathiques agit sur deux types de récepteurs :

- Les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques ( $\alpha$ -ARs) responsables d'une contraction.
- Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -ARs) responsables d'une relaxation.

Les  $\alpha$ -ARs sont subdivisés en deux sous-types,  $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ -AR. Les  $\alpha_1$ -AR sont couplés à un RCPG de type  $G_{q/11}$  qui active la voie de l'IP3 (Guimarães and Moura, 2001). Ils sont largement exprimés au niveau des artères irriguant les reins, les territoires splanchniques et la peau. Dans ces organes, la vasoconstriction qui résulte de leur activation provoque une hypoperfusion locale. Les  $\alpha_2$ -ARs sont présents essentiellement au niveau des veines où leur activation provoque une faible vasoconstriction qui favorise le retour veineux. Ils activent des RCPGs couplés à une  $G_i$  (Guimarães and Moura, 2001).

Les  $\beta$ -ARs sont classés en trois sous-types, les récepteurs  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - et  $\beta_3$ -AR (Bylund et al., 1994). Au niveau artériel, les récepteurs  $\beta$ -ARs sont responsables d'une vasodilatation par libération d'un second messager vasorelaxant : l'AMPc. Le sous-type  $\beta_2$ -AR est prédominant, excepté au niveau des artères coronaires où les  $\beta_1$ -ARs sont majoritaires (Begonha et al., 1995). Les propriétés des  $\beta$ -ARs vasculaires seront décrites dans le chapitre 2 de l'introduction. De manière générale, l'innervation sympathique exerce un tonus vasoconstricteur majoritaire pour deux principales raisons : d'une part, la densité des récepteurs  $\alpha$ -AR est prédominante par rapport à

celle des  $\beta$ -AR dans la plupart des vaisseaux, d'autre part, car la NA a une affinité supérieure pour les récepteurs  $\alpha$ 1-AR.

#### **1.4.1.2. Régulation par le système parasympathique**

Le neurotransmetteur associé à ce système est l'Ach. Il agit via les récepteurs muscariniques  $M_1$ ,  $M_2$  ou  $M_3$ . Contrairement au système sympathique qui innerve tous les vaisseaux, le système parasympathique se limite à quelques territoires comme les artères cérébrales et les artères des tissus érectiles. Dans d'autre type vasculaire comme l'artère coronaire, les récepteurs muscariniques sont bien exprimés mais il n'existe pas de terminaison nerveuse parasympathique à ce niveau (Reid et al., 1985). Les CMLVs expriment les sous-type  $M_3$  alors que les CE expriment les sous-type  $M_1$  et  $M_2$  (Eglen et al., 1996). Les récepteurs  $M_3$  sont associés à un effet vasoconstricteur par activation de la voie de l'IP3, alors les autres sous-types induisent un effet vasorelaxant de façon indirect. En effet, leur activation, stimule la libération d'un puissant agent vasodilatateur endothélial qui est le NO. Une fois produit, il diffuse dans la CML (Féléto et al., 2012) (cette partie sera décrite dans le chapitre 2 de l'introduction).

#### **1.4.1.3. Régulation par le système nerveux sensoriel**

Les neurones moteurs sensoriels sont activés par une variété de stimuli physiques et chimiques et utilisent comme neurotransmetteurs la substance P et la CGRP (Kawasaki et al., 1988, 1990; Maggi and Meli, 1988). Ces neuropeptides jouent un rôle déterminant dans le processus inflammatoire en provoquant une vasodilatation des vaisseaux cutanés, mais également une hypersensibilité qui va préserver la zone lésée d'une autre atteinte. Dans l'artère coronaire, la CGRP serait responsable d'une vasodilatation indépendante de l'endothélium et contribuerai à la préservation du tonus de cette artère dans l'athérosclérose (Luu et al., 1995).

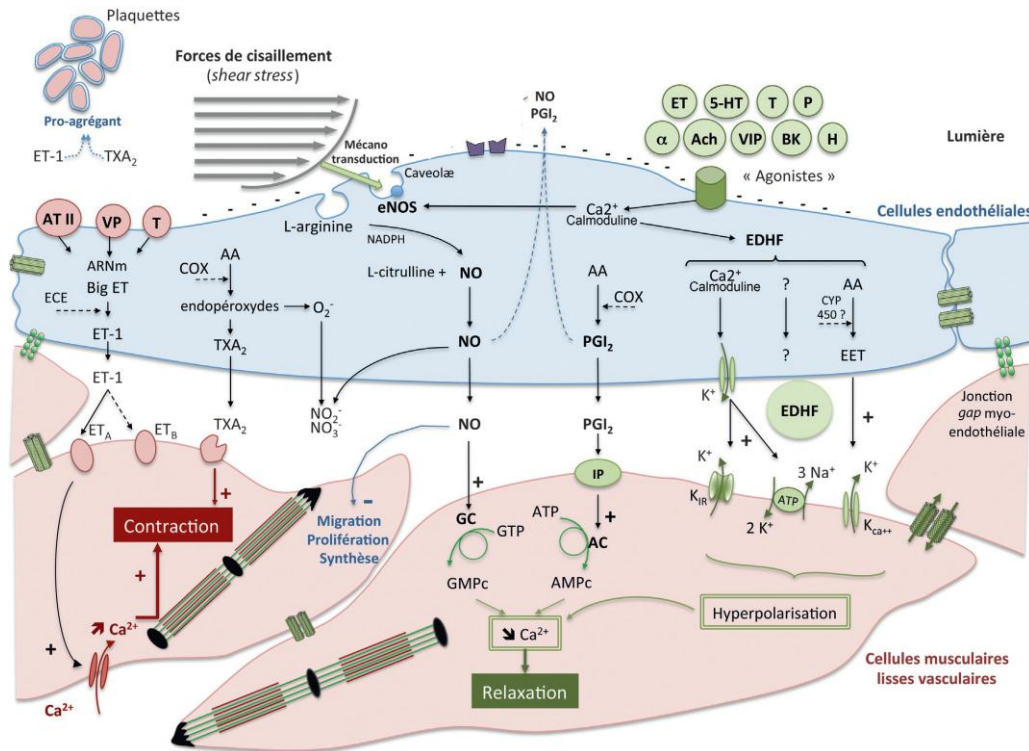
#### **1.4.2. Régulation hormonale : rôle de l'endothélium**

Le contrôle endothélial du tonus vasculaire constitue une étape clé dans la régulation locale de la fonction artérielle, faisant intervenir le couple « endothélium – CMLV », dans lequel la CE joue le rôle d'intégrateur des informations et la CMLV celui d'effecteur. Diverses substances chimiques telles que l'Ach, la sérotonine (5-HT), l'histamine, la thrombine, les purines, l'AT II et le peptide intestinal vasoactif (VIP) régulent le tonus vasculaire en activant des voies endothéliales qui stimulent la production locale de facteurs :

- Pro-contractants, regroupés sous le terme *endothelium derived contracting factors* (EDCF).

- Pro-relaxants, regroupés sous le terme *d'endothelium-derived relaxing factors* (EDRF).

Ces différents facteurs agissent ensuite sur la CMLV pour activer des voies de signalisation spécifiques entraînant soit une contraction ou une relaxation des CMLV (Figure 8).



**Figure 8 : Rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus des CMLs** (Pérez-Martin et al., 2016).

AA : acide arachidonique, AC : adénylate cyclase, ATII : angiotensine II, Ach : acétylcholine, BK : bradykinine, COX : Cyclooxygénase ; CYP450 : cytochrome P450 ; ECE : enzyme de conversion de l'endothéline, EET : acides époxyeicosatriénoïques, ET-1 : endothéline 1, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> : récepteurs de l'endothéline de type A et de type B, GC : guanylate cyclase, GMPC : guanosine monophosphate cyclique, GTP : guanosine-triphosphate, H : histamine ; 5-HT : sérotonine, IP : récepteur des Prostacyclines, NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthase endothéliale, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : nitrite ; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : nitrate ; O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde, P : purines, PGI<sub>2</sub> : prostacycline, T : thrombine, TXA<sub>2</sub> : Thromboxane A<sub>2</sub>, VIP : peptide intestinal vasoactif, VP : vasopressine.

### 1.4.2.1. Les EDRFs, facteurs relaxants dépendants de l'endothélium

#### 1.4.2.1.1. Le monoxyde d'azote

C'est en 1980 que le rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus des CMLV a été mis en évidence. En effet, Furchgott et Zawadzki ont démontré que l'effet vasorelaxant de l'Ach était dépendant des CEs (Furchgott et al., 1980). Par la suite, l'équipe de Palmer a identifié le NO

comme étant un facteur endothéliale pro-relaxant (Palmer et al., 1987), capable d'activer la guanylate cyclase soluble (GCc).

Le NO joue le rôle de médiateur-relais pour de nombreuses substances vasorelaxantes comme la bradykinine, l'histamine, la 5-HT, l'Ach et les purines mais aussi à des stimuli mécanique tel que les forces de cisaillements ou *shear stress* (voir partie 2 du chapitre 1.3). Le NO est une molécule radicalaire, gazeuse, liposoluble, à demi-vie très courte (de quelques millisecondes à quelques secondes). Il est formé sous l'action de la NO synthase (NOS), par oxydation de la L-arginine en L-citrulline en présence de cofacteurs tels que la BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine) (Daff, 2010).

Il existe trois types de NOS (Villanueva and Giulivi, 2010) :

- NOS de type 1 (neuronal- nNOS) et NOS de type 3 (endothéliale – eNOS) qui sont constitutives. Leur activation est sous la dépendance de plusieurs mécanismes passant le plus souvent par une augmentation de la concentration en  $[Ca^{2+}]_i$  (Presta et al., 1997).
- NOS de type 2 (inductible – iNOS), activé par des substances inflammatoires ou toxiques (Hansson et al., 1994).

La eNOS est une protéine de 135 kDa renfermant un domaine oxygénase (partie N-terminale) et un domaine réductase (partie C-terminale) reliés par une courte séquence protéique qui lie la CaM. La NOS fonctionne sous forme de dimère. L'augmentation des  $[Ca^{2+}]_i$  dans la CE permet la formation du complexe  $Ca^{2+}$ -CaM qui active la eNOS.

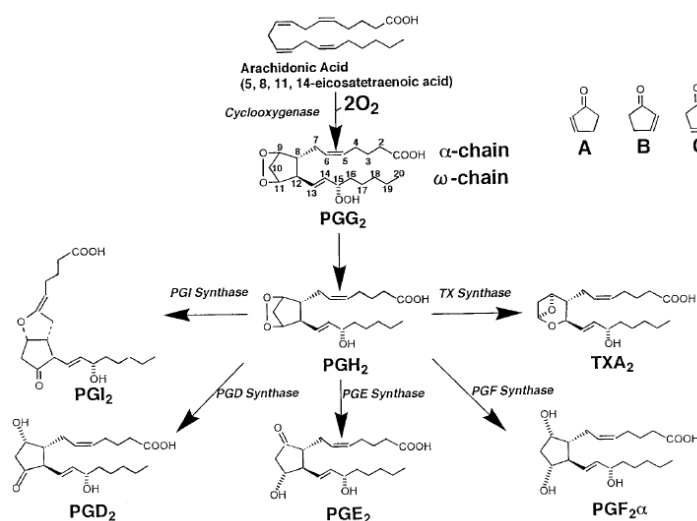
L'état de phosphorylation/déphosphorylation constitue un deuxième mécanisme de régulation de la eNOS de façon indépendante du  $Ca^{2+}$ . Deux sites de phosphorylation ont été identifiés : un site activateur sur la sérine 1177 et un site inhibiteur sur la Thérionine 495 (Corson et al., 1996; Dimmeler et al., 1999; Lin et al., 2003). En réponse aux contraintes de cisaillement ou *shear stress*, la phosphorylation de la eNOS a lieu sur la sérine 1177 par voie PI3-kinase/Akt (Corson et al., 1996; Dimmeler et al., 1999). D'autre kinase comme la PKA et la mitogen-activated protein kinases (MAPK) phosphoryle la eNOS sur ce même site. La phosphorylation sur le résidu Thérionine 495 est orchestrée par la PKC et l'AMPK pour *AMPactivated protein kinase* (Chen et al., 1999).

Une fois produit, le NO exerce son effet relaxant en activant le GCc dans la CMLV. Cette dernière stimule la production d'un second messager, le 3'-5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui module l'activité de nombreux effecteurs intracellulaire pour induire une réponse relaxante (Morgado et al., 2011). Cette partie sera décrite dans le chapitre 2 de l'introduction.

Le rôle majeur du NO dans la régulation du flux coronaire a été démontré par l'étude de Lefroy (Lefroy et al., 1993) dans laquelle l'inhibition de la eNOS (enzyme assurant la synthèse du NO) dans l'artère coronaire humaine diminuait fortement le flux coronaire épigardique. De plus, Brown (Brown et al., 1993) a souligné la participation de ce médiateur dans la vasorelaxation coronaire dans des conditions d'hypoxie (Webb et al., 2004; Zweier et al., 1999). En effet, dans ces conditions particulières, la production du NO n'est pas seulement assurée par la NOS cardiaque, mais aussi par un autre mécanisme : la réduction des nitrites. L'ensemble de ces mécanismes permet d'augmenter le flux coronaire afin de limiter des dommages causés par une ischémie myocardique.

#### 1.4.2.1.2. Les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>)

Ce sont des prostanoides (PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et/ou PGF<sub>2α</sub>), dérivés d'acides gras. L'AA constitue le précurseur commun des prostanoides. Il est produit dans les CEs à partir des phospholipides membranaires, sous l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Mathe et al., 2010; Needleman and Kaley, 2010). Il est d'abord transformé en endoperoxide cyclique par une enzyme : la cyclo-oxygénase (COX), puis en prostaglandine I<sub>2</sub> par la prostaglandine I<sub>2</sub> synthétase (Figure 9) (Macintyre et al., 1978).



**Figure 9 : Voies de synthèses des prostanoides** (Narumiya et al., 1999).

Il existe deux isoformes de COX :

- La COX-1 exprimée de façon constitutive.
- la COX-2, est l'isoforme dont l'expression est induite lors de certaines pathologies et du vieillissement et conditions inflammatoires (Shi et al., 2008).



La prostacycline est le premier prostanoïde à avoir été identifié en 1976 (Moncada and Vane, 1978). Une fois synthétisée, la prostacycline diffuse à travers la membrane de la CE, pour ensuite agir sur des récepteurs de type IP, situés à la membrane de la CMLV. Ce sont des RCPG couplés à une  $G_{as}$ , leur activation induit un effet relaxant par stimulation de la voie AMPc/PKA (Narumiya et al., 1999). La prostacycline est un puissant agent vasodilatateur utilisé en thérapeutique pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Barst et al., 1994). Plusieurs études réalisées sur des préparations de vaisseaux isolés dans des conditions d'hypoxie, ont rapporté une augmentation de la libération de prostacycline vasodilatatrice (Busse et al., 1984; Kalsner, 1977) suite à l'augmentation de l'activité de la phospholipase A<sub>2</sub> endothéliale (Michiels et al., 1993).

#### **1.4.2.1.3. EDHF (*Endothelium derived hyperpolarizing factor*)**

L'EDHF met en jeu des canaux potassiques spécifiques : appelés  $K_{Ca}$  car activés par le  $Ca^{2+}$  (Garland and Dora, 2017), exprimés dans les CEs et les CMLVs.

Au niveau endothélial, deux types de  $K_{Ca}$  sont exprimés : ceux à faible conductance,  $SK_{Ca}$  et ceux à conductance intermédiaire, les  $IK_{Ca}$ . Ils s'activent suite à une augmentation des  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui conduit à l'hyperpolarisation de la CE, transférée aux CMLVs par l'intermédiaire de mécanismes :

- Chimique : l'endothélium produit divers médiateurs vasoactifs tels que peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) mais également le  $K^+$ .
- Électrique : *via* les jonctions communicantes myoendothéliales. Ce sont des connexines qui délimitent un pore central assurant les échanges entre les CEs et les CMLVs et permettant une communication électrochimique.

Au niveau des CMLVs, l'ouverture des canaux  $K^+$  ( $BK_{Ca}$ ,  $K_{ir}$ ) génèreraient une hyperpolarisation membranaire qui s'accompagne de la fermeture des canaux LTCC, aboutissant à la relaxation (Busse et al., 2002).

#### **1.4.2.1.4. Les EDCFs, facteurs contractants dépendants de l'endothélium**

##### **1.4.2.1.4.1. Les prostanoïdes $TXA_2$ , $PGH_2$ , $PGE_2$ et $PGF_{2\alpha}$**

Ils dérivent de l'AA comme décrit dans la partie 2.1.2 du chapitre 1.4 de l'introduction. Ils sont produits en réponse à divers stimuli comme l'AT II, les catécholamines et la thrombine. Plusieurs études ont souligné le rôle majeur des  $TXA_2$ ,  $PGH_2$ ,  $PGE_2$  et  $PGF_{2\alpha}$ , dans l'induction d'une contraction des CMLVs de façon dépendante de l'endothélium (Vanhoutte et al. 2005).

Une perturbation du métabolisme des prostanoides a été rapportée dans certaines pathologies coronaires. Lors de l'athérosclérose, il semblerait que l'expression de l'isoforme inducible de la COX (COX-2) dans les CEs et les CMLVs soit stimulée. Tandis que dans l'infarctus du myocarde, l'expression des récepteurs au TXA<sub>2</sub> et PGF<sub>2α</sub> semble augmentée et celle du PGI<sub>2</sub> diminuée (Ozen and Norel).

#### **1.4.2.1.4.2. L'endothéline (ET-1)**

C'est un peptide de 21 acides aminés, appartenant à la famille des endothélines, découvert en 1985 par Hickey et ses collaborateurs (Hickey et al., 1985). L'endothéline existe sous 3 isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) et l'isoforme ET-1, est la plus exprimée au niveau vasculaire. Son expression y est stimulée par les catécholamines, l'AT II et la thrombine et inhibée par l'enzyme de conversion. L'ET-1 agit sur deux récepteurs de la famille des RCPGs : ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Ils sont localisés sur les CMVLs où ils induisent une vasoconstriction par un mécanisme Ca<sup>2+</sup>-dépendant suite à l'activation de la voie de la voie de l'IP3. Les CEs n'expriment que le récepteur ET<sub>B</sub> dont l'activation est responsable d'une vasorelaxation par production de NO et de prostacycline (Schiffrin, 2005). L'action de l'ET sur les récepteurs ET<sub>B</sub> semble prévenir la dysfonction endothéliale comme il a été montré dans une étude réalisée sur un modèle murin de délétion du gène codant pour le récepteur ET<sub>B</sub> (Bagnall et al., 2006).

#### **1.4.2.1.4.3. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

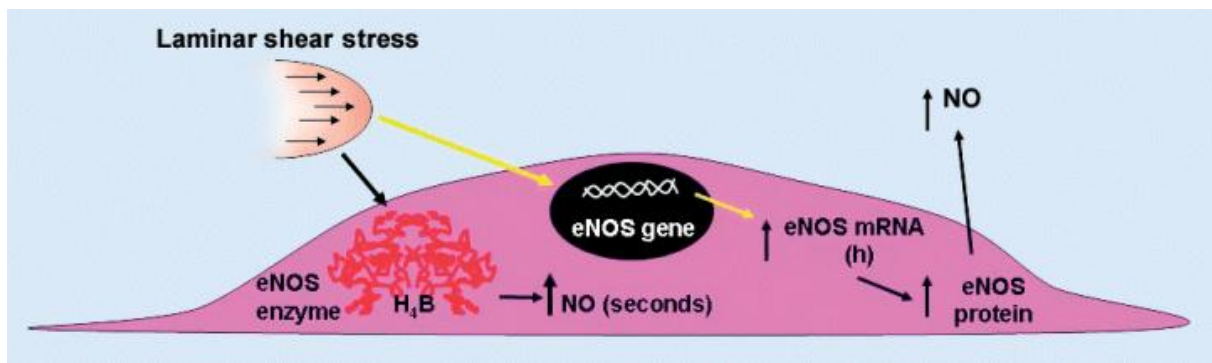
Ils regroupent l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le radical hydroxyl et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et sont générés lors du métabolisme cellulaire. Ils peuvent entraîner un stress oxydatif lors d'une surproduction rencontrée dans certains contextes pathologiques comme l'hypertension artérielle (HTA), le diabète et l'athérosclérose (Félétou and Vanhoutte, 2007). Les ERO sont capables d'induire une vasoconstriction par l'inhibition des trois principales voies de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium (Félétou and Vanhoutte, 2007) :

- la voie du NO : ils réduisent la biodisponibilité du NO et inhibent sa principale, cible la GCc par inactivation oxydative (Münzel et al., 2005).
- La voie de la PGI<sub>2</sub> par inhibition de la prostacycline synthase.
- La voie de l'EDHF par inhibition de l'activité des canaux K<sup>+</sup> et diminution de couplage électrique par interaction avec différentes connexines formant les jonctions communicantes.

### 1.4.3. Régulation par les contraintes de cisaillement ou *shear stress*

La paroi vasculaire est constamment exposée, dans des conditions physiologiques, à un flux sanguin laminaire. Il y exerce une pression et génère des frottements de la colonne de sang sur la surface endothéliale. Ces frictions appelées «contrainte de cisaillement, ou *shear stress*, sont capables d'influencer directement les propriétés des CEs qui y sont exposées. De façon générale, le *shear stress* est décrit comme ayant un rôle vasodilatateur en modulant l'expression génique de la eNOS et en stimulant son activité (Harrison et al., 2006a) (Figure 10).

- **Modulation de l'expression génique de la eNOS** : le flux sanguin laminaire stimule la synthèse et de l'ARNm codant pour la eNOS et son maintien dans un état stable (Nishida et al., 1992; Uematsu et al., 1995). Cette voie de signalisation met en jeu une tyrosine kinase c-Src qui jouerait un rôle majeur dans la stabilisation des transcrits codant pour la eNOS (Davis et al., 2001).
- **Modulation de l'activité de la eNOS** : comme décrit de la partie 2.1.1 du chapitre 1.4 de l'introduction, l'activité de la eNOS est stimulée soit par le  $\text{Ca}^{2+}$ , soit par phosphorylation.



**Figure 10 : Effet du shear stress sur la eNOS** (Harrison et al., 2006a).

La flèche noire indique la modulation de l'activité enzymatique de la eNOS. La flèche jaune indique la modulation de l'expression génique de la eNOS.

### 1.4.4. Régulation par étirement de la paroi vasculaire : rôle du tonus myogénique

Découvert en 1902 par Baylis, le tonus myogénique est défini comme la capacité des artères de résistance à se contracter suite à une élévation de la pression intraluminale (abordé dans la partie

4.1.2 du chapitre 1.2 de l'introduction). De nombreux canaux ioniques sont impliqués dans la réponse myogénique. On distingue :

- **Les LTCC** : activés par la dépolarisation, leur ouverture entraîne un influx calcique vers le cytosol ce qui contribue à l'initiation de la contraction (voir partie 4.1.2 du chapitre 1.2 de l'introduction).
- **Les canaux activés par l'étirement (*Stretch-activated channels*)** : Ils sont présents dans de nombreux lits vasculaires dont l'artère coronaire et l'artère mésentérique. Ce sont des canaux ioniques cationiques non sélectifs. L'étirement membranaire entraîne le plus souvent un courant sodique à l'origine de la dépolarisation (Davis et al., 1992; Wu and Davis, 2001).
- **Les canaux TRP pour *Transient Receptor Potential*** : il s'agit d'une famille comprenant plus de 50 canaux perméable aux cations. Ces canaux sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques avec une implication particulière des TRPC6 et TRPM4 dans la réponse myogénique. En effet, la diminution de l'expression du TRPC6 affecterait la dépolarisation entraînant une altération de la réponse myogénique (Spasova et al., 2006). De la même manière TRPM4 serait indispensable à la réponse myogénique (Earley et al., 2004).
- **Le canal sodique épithélial (ENaC)** : Un rôle important du canal ENaC $\beta$  dans la réponse myogénique a été décrit au niveau d'artères rénales interlobulaires (Jernigan and Drummond, 2005, 2006) et plus particulièrement dans la réponse médiée par l'autorégulation du flux sanguin rénal (Grifoni et al., 2010).

### 1.4.5. Régulation par des facteurs métaboliques

Cette voie de régulation prend une importance particulière dans l'artère coronaire. En effet, bien que la pression de perfusion varie, les artères coronaires doivent pouvoir s'adapter pour assurer un flux constant. On parle alors d'autorégulation instantanée qui est sous contrôle métaboliques par plusieurs mécanismes :

#### 1.4.5.1. L'oxygène

En premier lieu, l'O<sub>2</sub> agit comme un vasoconstricteur alors qu'une carence en oxygène provoque une vasodilatation coronarienne par libération d'adénosine, de NO et PGI<sub>2</sub> (Feigl, 1983). Leurs voies de production en hypoxie seront abordées individuellement par la suite.

L'ensemble de ces composés physiologiques a un effet vasodilatateur en diminuant l'influx calciques *via* les LTCC et en activant des canaux potassiques (BK<sub>Ca</sub> et K<sub>ATP</sub>) qui provoque une hyperpolarisation de la membrane des CMLs (Deussen et al., 2012).

### 1.4.5.2. L'adénosine

C'est en 1963 que Berne (Berne, 1963) rapporte le rôle majeur de l'adénosine dans la régulation du flux coronaire. Ce composé joue un rôle vasodilatateur majeur. Il est libéré lorsque la  $PO_2$  diminue en dessous des besoins métaboliques (hypoxie, ischémie, exercice physique).

L'adénosine dérive de l'hydrolyse de l'AMP (adénosine monophosphate) par la 5'-nucléotidase cytosolique ou l'ecto-5'-nucléotidase membranaire (CD73). Lors d'une carence en  $O_2$ , le produit de dégradation de l'ATP (adénosine triphosphate), l'AMP, ne peut être régénéré de façon suffisante en ATP. Il en résulte une accumulation d'adénosine dans le myocarde. Ce dernier, une fois libérée dans le plasma, dispose d'une demi-vie extrêmement courte, environ une seconde, car il est vite capté au niveau des érythrocytes pour y être métabolisé par l'adénosine désaminase (Tabrizchi and Bedi, 2001). Par conséquent, des effets à distance des sites de sa libération sont peu probables et l'adénosine aurait une action majoritairement locale.

L'adénosine exerce ses effets physiologiques par l'intermédiaire de récepteurs purinergiques  $P_1$  de type  $A_1$ ,  $A_2$  ( $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ) et  $A_3$ , par opposition aux récepteurs  $P_2$  qui ont comme ligand l'ATP, l'ADP, l'UTP et l'UDP (Ralevic and Burnstock, 1998).

Les récepteurs  $P_1$  sont des RCPG, largement distribués dans l'organisme. Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés aux récepteurs distribués dans le système cardiovasculaire :

- **Les récepteurs  $A_1$  (Rc  $A_1$ )** se trouvent dans le cœur : au niveau des oreillettes, ventricules, nœuds sinoatrial et auriculoventriculaire (Belardinelli et al., 1989) et dans l'artère coronaire (Dart and Standen, 1993). Ce sont des récepteurs associés à une protéine  $G_{i/o}$ . Ils sont couplés négativement à l'AC, ce qui contribue à la diminution de l'influx calcique (Freissmuth et al., 1991) et couplés positivement à certains canaux potassiques ( $K_{ir}$ ,  $K_{ATP}$ ) dont l'activation entraîne une hyperpolarisation membranaire. L'activation des Rc  $A_1$  entraîne au niveau cardiaque : un effet chronotrope, dromotrope et inotrope négatifs et une bradycardie par antagonisme l'effet  $\beta$ -adrénergique des catécholamines (Belardinelli et al., 1995). Au niveau de l'artère coronaire, leur activation provoque une vasodilatation.

- **Les récepteurs  $A_2$  (Rc  $A_2$ )** sont exprimés exclusivement dans les vaisseaux. Ils existent sous deux isoformes :  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$ . Les CMLs et CEs expriment l'isoforme  $A_{2A}$  tandis que l'expression de l'isoforme  $A_{2B}$  se limite aux CEs (Ralevic and Burnstock, 1998). Les Rc  $A_2$  sont des RCPG couplés à une  $G_s$ . Leur activation provoque, au niveau endothélial, une libération de NO et, au niveau de la CML, une hyperpolarisation membranaire par activation des  $K_{ATP}$  (Belardinelli et al., 1998; Erga et al., 2000; Hein and Kuo, 1999).

- **Les récepteurs A<sub>3</sub> (Rc A<sub>3</sub>)** n'ont pas été très étudiés. On leur a associé quelques effets vasodilatateurs coronaires qui seraient dus à l'activation de la PKC qui stimulerait l'ouverture des K<sub>ATP</sub> (Armstrong and Ganote, 1995; Jenner and Rose-Meyer, 2006).

## **1.5. Altérations vasculaires rencontrées lors de l'insuffisance cardiaque**

### **1.5.1. Définition et épidémiologie de l'IC**

L'IC est définie comme une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur conduisant à un apport en oxygène insuffisant pour répondre aux besoins métaboliques des différents organes.

L'IC constitue un important problème de santé publique par sa fréquence, sa mortalité, mais aussi par sa morbidité et les ressources médicales et économiques significatives qu'elle absorbe. En occident l'IC est de loin l'affection la plus fréquente, la plus coûteuse et de pronostic réservé (Ponikowski et al., 2016). L'IC est une pathologie qui affecte particulièrement les personnes âgées. En France, la prévalence de l'insuffisance cardiaque dans la population adulte est estimée à 2,3 %, soit à plus d'un million de personnes. Elle dépasse 15 % chez les personnes âgées de 85 ans ou plus. En 10 ans, le nombre de personnes souffrant d'insuffisance cardiaque a augmenté de 30 % et 120 000 cas sont dépistés chaque année (Franzin-Garrec, 2013).

L'IC est une pathologie chronique, émaillée d'épisodes de décompensations aiguës, sources d'hospitalisations récurrentes dont la létalité est élevée. Elle représente la première cause d'hospitalisation des plus de 60-65 ans (Logeart et al., 2013). En France, le nombre d'hospitalisations pour l'IC s'est élevé à 210 490 en 2010. La mortalité à un an est de l'ordre de 30 % et de 40 % à deux ans (Tuppin et al., 2014). Le coût annuel des hospitalisations représente 63 % des dépenses de santé remboursées pour les patients en affection de longue durée (ALD) pour IC, soit plus d'un milliard d'euros d'après la caisse nationale d'assurance maladie en 2012. Malgré une réduction significative de la mortalité entre 2000 et 2010, de l'ordre de 30 %, l'IC reste une cause de mortalité fréquente en France, notamment chez les personnes âgées. Le pronostic reste mauvais puisque la moitié des patients meurent dans les 3 à 5 années suivant l'apparition des symptômes d'IC (Franzin-Garrec, 2013).

### **1.5.2. Physiopathologie de l'IC**

C'est un syndrome complexe et hétérogène qui regroupe des étiologies, des mécanismes physiopathologiques et des expressions cliniques diversifiés. L'insuffisance cardiaque peut être une complication de différentes pathologies cardio-vasculaires : les cardiopathies ischémiques

en premier lieu, mais aussi l'hypertension artérielle, le diabète, les cardiopathies valvulaires, les maladies du rythme cardiaque telles que la fibrillation auriculaire. Lorsque l'IC est associée à une dysfonction systolique, on parle d'IC à fraction d'éjection altérée alors que lorsque l'IC est associée à une dysfonction diastolique, on parle d'IC à fraction d'éjection préservée.

Lors de l'IC, l'activation des systèmes neurohormonaux (le SNA sympathique, le système rénine-angiotensine-aldostérone, le système arginine-vasopressine, et les peptides natriurétiques) permet une vasoconstriction qui agit comme un mécanisme compensatoire afin de maintenir la perfusion des organes vitaux, par la restauration de la pression sanguine dans le cœur défaillant. L'activation de ces systèmes impacte d'abord le muscle cardiaque entraînant un épaissement du ventricule gauche et un allongement des fibres cardiaques. Ces modifications morphologiques permettent, dans un premier temps, d'augmenter la force contractile du myocarde. On parle alors, d'hypertrophie cardiaque compensée. Ce mécanisme adaptatif devient délétère à long terme en augmentant les pressions de remplissage cardiaque, en générant des œdèmes et en favorisant un remodelage cardiaque.

### **1.5.3. Altérations vasculaires associées à l'IC**

Dans l'IC, l'activation neuroendocrinienne devient délétère sur le système vasculaire, en particulier sur la fonction coronaire. Cette dernière est cliniquement évaluée par la mesure de la réserve coronaire définie par le rapport entre le débit coronaire maximal induit par un vasodilatateur et le débit au repos.

Dans l'hypertrophie du cœur, stade pathologique précédant l'IC, la diminution de la réserve coronaire constitue un trait caractéristique du remodelage du muscle cardiaque (Vatner and Hittinger, 1993). C'est ainsi que chez des patients présentant une hypertrophie ventriculaire, associée soit à une hypertension (Hamasaki et al., 2000; Opherk et al., 1984) soit à une cardiomyopathie (Misawa et al., 2002), il a été constaté une diminution de la réserve coronaire. Ceci se traduit par une incapacité à répondre à l'augmentation des besoins métaboliques du muscle cardiaque hypertrophié et contribuerait à l'aggravation de la pathologie et l'augmentation du risque ischémique (Cecchi et al., 2003; Vatner and Hittinger, 1993).

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la diminution de la réserve coronaire dans le remodelage pathologique du cœur chez l'homme. On distingue notamment, le remodelage de la paroi vasculaire avec un épaissement de l'adventice (McGoldrick et al., 2007) la raréfaction des microvaisseaux par rapport au volume cardiaque à irriguer et une dysfonction de la vasomotricité des artères coronaires (Hamasaki et al., 2000; Opherk et al., 1984).

L'utilisation de modèles animaux d'hypertrophie et d'IC permet de tester de manière plus approfondie ces hypothèses. Ainsi, il a été montré dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression (réalisation d'une sténose de l'aorte ascendante) chez le cochon d'Inde, une diminution des réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium mais aussi des voies indépendantes de l'endothélium observées sur des segments d'artères coronaires isolées, en comparaison aux artères isolées d'animaux contrôles. Ceci était associé à une modification de la morphologie de l'artère coronaire chez les animaux hypertrophiés avec un épaississement de la paroi des vaisseaux (McGoldrick et al., 2007).

Les altérations vasculaires associées à l'endothélium ne sont pas spécifiques de l'artère coronaire, ni de l'IC. Elles résultent d'un déséquilibre dans la libération des facteurs endothéliaux avec (Fang and Marwick, 2002) :

- Une augmentation de la libération des facteurs endothéliaux procontractants (EDCF).
- une diminution de la libération des facteurs endothéliaux prorelaxants (EDRF).

Le NO constitue un des principal facteur relaxant dont la biodisponibilité est diminuée dans l'IC (Harrison et al., 2006b). Les causes en seraient multiples. L'une d'elle serait liée à la dérégulation de l'activité de la eNOS. En effet, dans l'IC l'altération de la contractilité du ventricule gauche entraîne une baisse du flux sanguin et par conséquent une diminution des contraintes de cisaillement (*shear stress*) activatrices de la eNOS (Harrison et al., 2006b). Une autre cause majeure de la diminution de la biodisponibilité du NO lors de l'IC est sa liaison aux ERO, notamment à l'anion superoxyde  $O_2^-$  pour former des peroxynitrites  $ONOO^-$  oxydantes (Bauersachs et al., 2002). L'augmentation de l'expression et l'activité de la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase augmente la production de  $O_2^-$  et en favorise la liaison au NO (Bauersachs et al., 1999). La diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et catalase) renforce le rôle délétère de la NADPH (Landmesser et al., 2002).

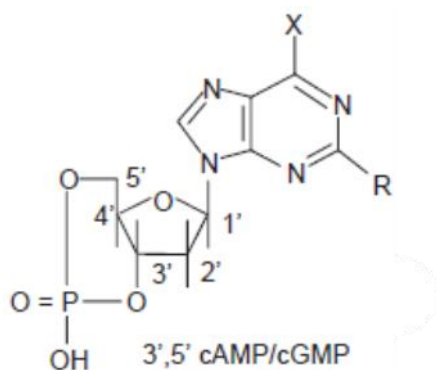
La dysfonction endothéliale n'est pas la seule cause des altérations vasculaire rencontrées dans cette pathologie. D'autres altérations impliquant la CML ont été décrites et seront abordées dans le chapitre 2.



## **2. Voies des nucléotides cycliques dans le système vasculaire**

Les nucléotides cycliques (NC), représentés par le 3',5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et le 3'-5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Figure 11), sont des seconds messagers intracellulaires qui régulent diverses fonctions physiologiques. Ils jouent le rôle d'intermédiaire aux neurotransmetteurs et hormones. Au niveau vasculaire, ils provoquent la relaxation (Morgado et al., 2011), ils inhibent la prolifération (Indolfi et al., 1997) et la migration des CMLVs et ils régulent la perméabilité de l'endothélium et son rôle dans la libération de facteurs vasoactifs (Cullere et al., 2005).

Les concentrations intracellulaires des NC résultent de l'équilibre entre leur production et leur dégradation. La production est assurée par les adénylates cyclases (AC) et les guanylates cyclases (GC) respectivement pour l'AMPc et le GMPc et leur élimination par les phosphodiesterases (PDE) et les protéines d'efflux.



**Figure 11 : Structure de l'AMPc et du GMPc** (Lugnier, 2006).

Pour l'AMPc : R = H et X = NH<sub>2</sub> ; pour le GMPc : R = NH<sub>2</sub> et X = O

### **2.1. Voie de l'AMPc**

#### **2.1.1. Voie de synthèse de l'AMPc**

##### **2.1.1.1. Les adénylates cyclases**

Il s'agit d'enzymes qui assurent la synthèse de l'AMPc à partir d'ATP en présence de Mg<sup>2+</sup>. Elles peuvent être membranaires, répertoriées en 9 isoformes (AC1-AC9) et régulées par la sous-unité  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques (activées par  $\alpha_s$  et inhibées par  $\alpha_i$ ). Une forme soluble a aussi été décrite (Chen et al., 2000). Elle est insensible aux protéines G hétérotrimériques et activée par le bicarbonate (Di Benedetto et al., 2013).

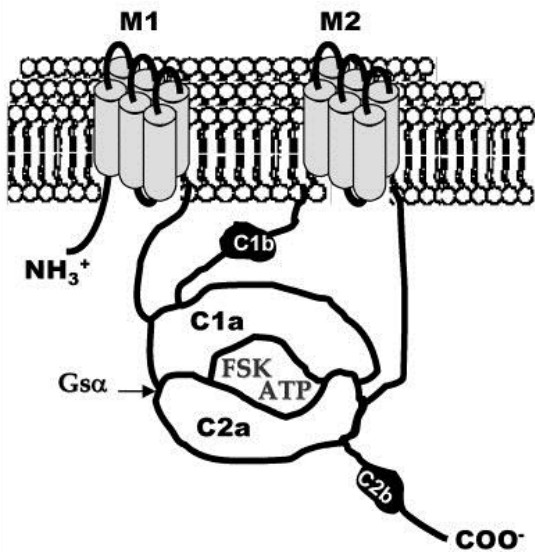
Les ACs sont formées de 2 régions transmembranaires (M1 et M2) associées à 2 régions cytoplasmiques (C1 et C2 divisées en C1a, C1b et C2a, C2b) (Krupinski et al., 1989). M1 et

M2 sont chacune constituées de 6 segments transmembranaires organisés en hélice  $\alpha$  (Figure 12). Les régions C1a et C2a s'associent en hétérodimères pour former le domaine catalytique ou se fixe l'ATP mais aussi un activateur pharmacologique : la forskoline (diterpène extrait de la plante *Coleus forskohlii*). Le domaine C2a contient le site de liaison pour les sous-unités  $\alpha_s$  et  $\beta/\gamma$  des protéines G hétérotrimériques et renferme en plus, pour les isoformes AC1, 2, 3, 7 et l'AC4, un site de phosphorylation pour la PKC. Cette phosphorylation peut être activatrice (AC1, 2, 3, 7) ou inhibitrice (AC4) (Sunahara and Taussig, 2002).

Pour les AC1, 3, 8, 5 et 6, la région C1a porte les sites de liaison pour la sous-unité  $\alpha_i$  et le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Dans les AC 1, 3 et 8, la liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  est activatrice alors qu'elle est inhibitrice pour les isoformes AC5 et AC6. La CAMKII peut aussi inhiber les AC 1, 3 et 8 (Sunahara and Taussig, 2002) alors que la PKA active les AC5 et AC6 (Sunahara and Taussig, 2002). La région C1b assure le lien entre M2 et C1a. Le second domaine non catalytique C2b est absent dans les isoformes AC1, 2, 3, 8 (Pavan et al., 2009).

Comme la plupart des autres types cellulaires, les CMLVs expriment certaines isoformes d'AC comme l'AC 3, 5, 6 pour lesquelles les transcrits ont été détectés (Webb et al., 2004). Leur expression à l'échelle protéique a été confirmée par l'étude d'Ostrom (Ostrom et al., 2002); lequel a rapporté une distribution au niveau de structure membranaire riche en cholestérol qu'on appelle caveolae.

D'un point de vue fonctionnel, il a été rapporté que la surexpression de l'AC1 et de l'AC3 dans les CMLs d'aorte de rat inhibe la prolifération cellulaire, alors que la surexpression de l'AC6 amplifie les changements morphologiques induits par une stimulation à l'isoprénaline ainsi que la phosphorylation de protéines induite par la forskoline (Gros et al., 2007). Enfin l'expression de l'AC8 semble augmentée dans les CMLVs en migration lors du processus d'athérosclérose et la resténose post-angioplastique (Gueguen et al., 2010).



**Figure 12 : Structure schématique de l'adénylate cyclase membranaire (AC) adapté de (Pavan et al., 2009).**

Les adénylates cyclases membranaires (ACs) sont constituées de 2 régions transmembranaires M1 et M2 (chacune constituée de 6 hélices) alternées par 2 régions cytoplasmiques C1 et C2. Ces deux régions renferment le domaine catalytique et les sites de liaison de la protéine  $G_{\alpha}$ , du complexe  $G\beta\gamma$  et de la forskoline et d'autres sites de régulation.

### 2.1.1.2. Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les RCPG sont des protéines formées de 7 domaines transmembranaires organisés en hélice  $\alpha$  reliés par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles du côté intracellulaire. Les extrémités N- et C-terminales sont respectivement extra- et intra-cellulaires. Ils sont associés à une protéine G hétérotrimérique, de localisation sous-membranaire, formée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'un dimère  $\beta\gamma$ . La fonction du RCPG est d'assurer la reconnaissance d'un signal externe et d'assurer sa transduction par activation de voie de signalisation spécifique. A l'état inactif, la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G lie une molécule de GDP. Dès l'activation du RCPG par la liaison à son agoniste, la sous-unité  $\alpha$  échange son GDP contre un GTP et se dissocie du dimère  $\beta\gamma$  pour activer des effecteurs cibles comme les kinases par exemple. L'activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  permet un retour à l'état initial désactivé par hydrolyse du GTP en GDP.

Il existe 4 familles de protéine G et seules les familles  $G_s$  et  $G_{i/o}$  sont associées à la signalisation de l'AMPc. En effet la protéine  $G_s$  est couplée positivement à l'AC permettant l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc ( $[AMPc]$ ) tandis que la  $G_{i/o}$  est couplée négativement à l'AC, contribuant à la diminution de la  $[AMPc]$ .

Les effets vasodilatateurs des  $\beta$ -ARs et des récepteurs à l'adénosine sont bien connus pour activer la voie de l'AMPc. Dans cette partie, nous nous intéresserons à la description des  $\beta$ -AR. Ils sont codés par trois gènes différents localisés sur les chromosomes humains 10 ( $\beta_1$ ), 5 ( $\beta_2$ ) et 8 ( $\beta_3$ ) (Bylund et al., 1994). Les catécholamines se lient aux  $\beta$ -AR avec des affinités différentes. Les  $\beta_1$ -ARs sont plus affins pour l'isoprénaline puis la NA et enfin l'adrénaline. Les  $\beta_2$ -ARs sont plus affins pour l'isoprénaline puis l'adrénaline et enfin la NA. Les  $\beta_3$ -ARs

sont plus affins pour l'isoprénaline puis la NA mais elle reste moindre que celle des  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-ARs (Lafontan, 1994).

#### **2.1.1.2.1. Rôle et distribution des $\beta$ -ARs au niveau vasculaire**

Les premières études réalisées par Lands en 1967 ont rapporté que l'expression des  $\beta$ -ARs dans le système vasculaire étaient limitées au  $\beta$ 2-AR. Par la suite, le développement de nouveaux outils pharmacologiques tel que les agonistes et antagonistes sélectifs des  $\beta$ -ARs a permis d'établir l'implication des  $\beta$ 1-ARs dans certaines réponses vasorelaxantes dans plusieurs lits vasculaires (Begonha et al., 1995; Chen et al., 2016; Guimarães and Moura, 2001).

Si les  $\beta$ 2-ARs sont prédominants au niveau vasculaire, il semblerait cependant que la réponse vasorelaxante soit essentiellement médiée par les  $\beta$ 1-AR dans les artères de résistance comme l'artère coronaire (Begonha et al., 1995; O'Donnell and Wanstall, 1984) et l'artère cérébrale (Edvinsson and Owman, 1974).

En 1989, un troisième sous-type de  $\beta$ -AR a été décrit, il s'agit du  $\beta$ 3-AR. Il a été identifié suite à l'observation dans l'aorte (Gray and Marshall, 1992) et l'artère mésentérique (Sooch and Marshall, 1997) de rat que l'effet relaxant de l'isoprénaline, agoniste non sélectif des  $\beta$ -AR n'était pas complètement aboli par le propranolol, antagoniste non sélectif des  $\beta$ -AR. L'implication du  $\beta$ 3-AR dans ces effets a été ensuite confirmée par l'utilisation d'agonistes  $\beta$ 3-AR sélectifs, le BRL-37344 (Rozec et al., 2005; Trochu et al., 1999).

La contribution de chaque sous-type de  $\beta$ -AR semble dépendre du lit vasculaire étudié, parfois même, du type cellulaire et même de l'agent contractant utilisé pour les expériences *ex-vivo*.

Prenons l'exemple de l'aorte de rat. Il a été rapporté une expression des trois sous-types de récepteur avec une prédominance pour le sous-type  $\beta$ 2 (Brawley et al., 2000; Oriowo, 1995). En effet, la relaxation induite par l'isoprénaline persistait même en présence d'antagonistes  $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-AR (Gray and Marshall, 1992; Oriowo, 1995; Sooch and Marshall, 1997) ce qui suggère l'existence d'un sous-type  $\beta$ 3. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'agonistes sélectifs  $\beta$ 3-ARs (BRL 37344, SR 58611A).

Dans les artères de résistances par contre, comme l'artère coronaire, l'artère cérébrale et l'artère mésentérique, il a été décrit une prédominance du sous-type  $\beta$ 1. Ceci a été confirmé par l'utilisation de souris invalidées pour le gène  $\beta$ 1 ou  $\beta$ 2 ou l'isoprénaline relâchait les artères mésentériques des souris invalidées pour  $\beta$ 2 mais pas pour  $\beta$ 1. De plus, l'utilisation d'un radioligand antagoniste des  $\beta$ -AR, l'iodocynalopindolol pour des expériences de liaison ligand-récepteur sur des CMLs isolées d'artère coronaire canine a révélé que la densité des sous-type

$\beta_1$  était plus importante que celle du sous-type  $\beta_2$  (Nakane et al., 1988). Toutefois, d'autres études rapportent que la relaxation adrénergique observée dans certaines artères de résistances implique la participation des  $\beta_2$ -AR (Chan et al., 2002; Kozłowska et al., 2003). Cette implication différentielle des deux sous-types de récepteurs pourraient être expliquées par la différence dans les conditions expérimentales dans lesquelles différents agents contractant ont été utilisés (phenyléphrine ou  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ).

Des données de la littérature soulignent l'existence des  $\beta$ -AR au niveau de l'endothélium vasculaire. Leur rôle fonctionnel a été évalué dans de nombreux lits vasculaires. Au niveau de l'artère coronaire épicaire de chien, il a été observé une augmentation du diamètre et du débit coronaire par l'isoprénaline, même en absence d'endothélium fonctionnel (Ghaleh et al., 1995). Ceci suggère, que la relaxation des artères coronaire par l'isoprénaline est indépendante de l'endothélium. Plusieurs autres études ont été réalisées dans l'aorte de rat dépourvus d'endothélium ou traités avec des inhibiteurs de la NOS. Ces expériences ont donné lieu à des résultats contradictoires. D'une part, les études de (Eckly et al., 1994; Konishi and Su, 1983; Moncada and Vane, 1978) ont révélé que la réponse à l'isoprénaline était indépendante de l'endothélium. D'autre part, les études de (Gray and Marshall, 1992; Kamata et al., 1989; Trochu et al., 1999) ont démontré un effet relaxant de l'isoprénaline dépendant de l'endothélium. Ces différences observées ont été attribuées à la nature de l'agent contractant utilisé et au niveau de pré-contraction. Par la suite, l'expression des récepteurs  $\beta$ -AR endothéliaux a été confirmée, *in vitro* par les expériences de liaison ligand-récepteur réalisées sur des CE isolées à partir d'aorte bovine (Steinberg et al., 1984), et *in situ*, par marquage immunohistochimique des  $\beta_3$ -AR dans l'aorte thoracique de rat (Rautureau et al., 2002).

En conclusion, il est clairement établi qu'une stimulation  $\beta$ -adrénergique au niveau vasculaire induit un effet relaxant. Les contributions de chaque sous-type dépendent du lit vasculaire et l'implication de l'endothélium restent discutées.

#### **2.1.1.2.2. Régulation de l'activité des $\beta$ -ARs**

L'activité des  $\beta$ -AR est régulée par un mécanisme de rétrocontrôle négatif appelé désensibilisation. Il s'agit d'un mécanisme dans lequel le  $\beta$ -AR est phosphorylé puis découplé de la protéine G. Ceci contribue d'une part à la diminution de l'affinité du récepteur pour son ligand endogène, les catécholamines, et d'autre part, à limiter la transduction du signal au niveau intracellulaire.

Deux types de désensibilisation ont été décrits :

- Désensibilisation hétérologue : appelée ainsi car elle ne requiert pas la fixation du ligand sur le récepteur et elle permet la désensibilisation pour d'autres ligands. Elle est orchestrée par la PKA qui phosphoryle des résidus thréonine et sérine de la boucle C-terminale du récepteur. Il en résulte un découplage rapide de la protéine  $G_{\alpha s}$  et parfois un couplage préférentiel à la protéine  $G_i$  qui inhibe l'activité des ACs (Daaka et al., 1997; Zamah et al., 2002).
- Désensibilisation homologue quant à elle, requiert la liaison du ligand à son récepteur. Elle est orchestrée par la famille de protéine GRK (kinase des récepteurs couplés G) qui regroupe trois familles : celle de la rhodopsine kinase (GRK1 et 7), celle des kinases spécifiques des  $\beta$ -ARs (GRK2 et 3) et celle de la GRK4 (GRK4, 5 et 6). La phosphorylation du récepteur permet le recrutement de la protéine  $\beta$ -arrestine. Cette dernière permet le découplage physique de la protéine G du récepteur. In vitro, la phosphorylation du récepteur  $\beta$ 2-AR par GRK2 augmente l'affinité du récepteur pour la  $\beta$ -arrestine par 10 à 30 fois. La  $\beta$ -arrestine participe également à l'internalisation des récepteurs en interagissant avec les molécules de clathrine. Celles-ci favorisent la formation de vésicules endocytosiques permettant ainsi leur recyclage à la membrane après déphosphorylation ou leur dégradation (Kohout and Lefkowitz, 2003). Contrairement aux  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2-ARs, les récepteurs  $\beta$ 3-ARs ne possèdent pas de sites de phosphorylation pour la PKA ou la GRK, et semblent donc réfractaires à la désensibilisation homologue ou hétérologue (Rozec and Gauthier, 2006).

### **2.1.2. Les effecteurs vasculaires de l'AMPc**

Classiquement, les effets de l'AMPc sont attribués à la PKA. Cependant il a été décrit l'implication de la PKG dans des conditions en faveur d'une forte augmentation de la [AMPc]. De plus, les études récentes ont permis de mettre en évidence l'existence d'un nouvel effecteur, Epac.

#### **2.1.2.1. La protéine kinase A**

La PKA est un hétérotétramère formé de deux sous-unités régulatrices (R) et deux sous-unités catalytiques (C) (Taylor et al., 1990). La sous-unité R permet de limiter l'activation de la sous-unité C tant qu'elle reste liée à elle. Chaque sous-unité régulatrice porte deux sites de fixation pour l'AMPc : le site A et le site B. seule l'occupation de chacun des 4 sites par une molécule d'AMPc active la PKA et permet la dissociation des sous-unités C et R. La conformation spatiale de la PKA à l'état inactif ne permet que la fixation de l'AMPc sur les sites B. A la suite,

il se produit un changement de conformation qui dévoile les sites A. La sous-unité C se dissocie de la sous-unité R et va réguler l'activité de plusieurs protéines cibles par phosphorylation.

Lorsque le taux d'AMPc diminue, les sous-unités R libèrent l'AMPc et se réassocient avec les sous-unités C, les inhibant à nouveau (Taskén and Aandahl, 2004).

L'utilisation de colonne chromatographique échangeuse d'ions a permis de séparer la PKA en deux types : la PKA de type I et la PKA de type II. Chacune possède sa propre sous-unité R (RI et RII) (Corbin and Keely 1977). Par la suite, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire a permis de classer la sous-unité R en sous-types : RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  et RII $\beta$  et la sous-unité C en 4 sous-type C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$  et PRKX ou *human X chromosome-encoded protein kinase X* (Taskén and Aandahl, 2004). Les 2 classes de PKA présentent des affinités différentes pour l'AMPc avec une constante d'activation de 50-100 nM pour les PKAI et 200-400 nM pour les PKAII. Les sous-unités R présentent des profils d'expression cellulaire et tissulaire différents et sont capables de s'homo- ou s'hétéro-dimériser générant ainsi un large panel de combinaisons responsables de la diversité et de la spécificité des réponses dépendantes de l'AMPc. Outre la régulation de la sous-unité catalytique de la PKA par ses sous-unités R, un peptide nucléaire, le PKI (protein kinase inhibitor), se lie à la sous-unité C et inhibe son activité indépendamment de l'AMPc (Kopperud et al., 2003). Le PKI est retrouvé dans le noyau et agit également en protéine chaperonne assurant l'export de la sous-unité C du noyau vers le cytoplasme. Les sous-unités C de retour dans le cytoplasme vont alors former des tétramères de PKA inactifs (Fantozzi et al., 1994).

La localisation subcellulaire de la PKA jouerait un rôle prépondérant dans le contrôle et la spécificité des effets induits par l'activation de la kinase. En effet, si la limitation de diffusion de l'AMPc dans le cytoplasme permet une compartimentation des signaux cellulaires liés à l'AMPc, celle-ci implique une localisation de la PKA au plus près des protéines cibles effectrices à activer spécifiquement. Ainsi, lorsque la concentration en AMPc augmente au voisinage d'une protéine d'ancrage de PKA (AKAP : A-Kinase Anchoring Protein), sa liaison à la sous-unité R libère la sous-unité C de la PKA qui peut ainsi phosphoryler rapidement et localement le substrat effecteur lié à l'AKAP. Ces protéines d'ancrage assurent donc une grande spécificité et une régulation spatio-temporelle des réponses cellulaires (Scott and Santana, 2010).

Au niveau vasculaire, il est admis que la PKA participe aux effets vasorelaxants des agents stimulant la production d'AMPc tel que les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ou l'adénosine. En effet deux études du groupe de Silver et al. (1982, 1984) (Silver et al., 1982, 1984), réalisées à partir

d'artère coronaire bovine, ont permis de corréler l'effet relaxant de l'isoprénaline et de l'adénosine à l'augmentation de l'activité enzymatique de la PKA. De plus, l'étude de Eckly et des collaborateurs (Eckly-Michel et al., 1997) a démontré par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la PKA, le H89, que l'effet vasorelaxant de faibles concentrations d'isoprénaline était dépendant de la PKA. Si la stimulation non sélective des récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  semble impliquer exclusivement la PKA, une stimulation spécifique des récepteurs  $\beta 2$  ne semble impliquer la PKA qu'en partie. C'est ce qu'a révélé l'étude de Ferro (Ferro et al., 2004) sur de l'aorte de rat, dans laquelle la relaxation fait intervenir la voie PI3K/Akt en plus de celle de la PKA. De plus, il a été proposé que les faibles concentrations d'AMPc activent préférentiellement la PKA tandis que des concentrations plus élevées activent en plus la PKG (Murthy and Makhoul, 1995). L'implication de la PKG permettrait la mise en jeu d'effecteurs de la voie de signalisation du GMPc.

### **2.1.2.2. Le facteur d'échange Epac**

En 1998, une nouvelle famille de protéines activées par l'AMPc, nommé Epac pour *exchange protein directly activated by cAMP* a été découverte (Kawasaki et al., 1988; de Rooij et al., 1998). L'AMPc se lie à la protéine Epac pour activer la famille Ras des petites GTPases, Rap1 et Rap2 (Bos, 2006), ce qui entraîne l'échange du GDP en GTP sur ces petites protéines G, permettant ainsi leur interaction avec les effecteurs spécifiques. L'activation de ces effecteurs contribue aux effets de l'AMPc qui sont donc indépendant de la PKA.

Epac est une protéine qui porte en sa région N-terminale des sous-unités régulatrices et une sa région C-terminale, des sous-unités catalytiques.

La région N-terminale se compose :

- D'un domaine d'adressage intracellulaire nommé DEP pour *Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin*.
- D'un domaine de liaison à l'AMPc nommé CNB pour *Cyclic nucleotide-binding domain* dont la séquence est très proche de celle de la sous-unité R de la PKA.

La région C-terminale se compose :

- D'un domaine REM pour *Ras exchange motif* stabilisant le domaine d'échange du GDP en créant un pont intramoléculaire entre les régions régulatrice et catalytique.
- D'un domaine GEF responsable de l'activité d'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G.

La protéine Epac existe sous deux isoformes, Epac1 et Epac2, produits de deux gènes indépendants chez les mammifères mais présentant une grande homologie de structure.



Epac1 est décrit pour être exprimé dans la CMLV (Purves et al., 2009; Roberts et al., 2013a) tandis que l'expression d'Epac2 est limitée au muscle lisse bronchique (Roscioni et al., 2011). Au niveau de l'endothélium, seule l'isoforme Epac1 a été détectée dans les HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) (Kooistra et al. 2005) et il a été montré que celle-ci possédait un effet anti-inflammatoire au niveau des cellules endothéliales en inhibant la sécrétion de l'interleukine-6 pro-inflammatoire, mais également en limitant la migration leucocytaire (Parnell et al., 2012).

Le rôle d'Epac dans le contrôle du tonus vasculaire a été peu étudié. Néanmoins, il a été suggéré qu'Epac régule l'activité de certains canaux potassiques importants pour l'établissement du potentiel de membrane. On distingue d'abord l'équipe de Purves qui a montré que dans les CMLs d'aorte de rat, Epac1 interagissait physiquement avec la sous-unité SUR2B (Sulfonylurea receptor 2B) des canaux  $K_{ATP}$  et que l'activation d'Epac1 semblait inhiber l'activité de ces canaux potassiques (Purves et al., 2009). Plus récemment, il a été montré que l'activation de la protéine Epac interagissait avec le couplage RyR-  $BK_{Ca}$  dans les artères mésentériques de rat. En effet, l'application d'un activateur d'Epac augmente la fréquence des *sparks* calciques dans les CMLVs. Cette augmentation localisée de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytosolique active alors les  $BK_{Ca}$ , responsables d'une hyperpolarisation de ces cellules et de la vasorelaxation (Roberts et al., 2013a).

## **2.2. Voie du GMPc**

### **2.2.1. Voie de synthèse du GMPc**

Elle est assurée par les guanylate cyclase (GC), capables de convertir le GTP en GMPc. Contrairement aux AC, les GC peuvent être membranaires ou cytosoliques. Les membranaires ou particulaire (GCp) sont des homodimères, récepteurs des peptides natriurétiques, alors que les guanylate cyclases dites cytosoliques ou soluble (GCc) sont des hétérodimères qui constituent la cible privilégiée du NO d'origine endothéliale ou exogène.

#### **2.2.1.1. Les guanylates cyclases solubles**

Les GCc purifiées de tissus humains et de rat sont composées (Kamisaki et al., 1986; Peter Humbert et al., 1990) de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . Deux isoformes ont été identifiées pour chaque sous-unité :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  respectivement et le dimère  $\alpha_1/\beta_1$  est décrit pour être le plus abondant (Koesling et al., 1990).

La structure des GCc est constituée de 3 domaines. La région N-terminale porte un groupement héminique indispensable à la fixation du NO. L'étude de Schmidt (Schmidt et al., 2004) a rapporté que la tyrosine en position 135 et l'arginine en position 139 sur la sous-unité  $\beta 1$  sont indispensables pour cette liaison. L'utilisation de diverses formes mutantes de GCc possédant de multiples délétions dans les régions N et C-terminale a souligné l'importance de la séquence en position 204 à 408 de la sous-unité  $\beta 1$  pour l'association à la sous-unité  $\alpha 1$  (Zhou et al., 2004). Le domaine C-terminal constitue la région la plus conservée et dont la structure se rapproche de celle des ACs mais avec une différence majeure : chez les AC, la reconnaissance du substrat se fait grâce à des résidus situés sur les domaines cytoplasmique C1 et C2, tandis que chez les GCc, les résidus sont distribués tout au long des deux chaînes  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (Harteneck et al., 1990).

Bien que la distribution des GCs soit communément décrite pour être purement cytosolique, certaines expériences réalisées sur fractions membranaires de cœur de rat ont révélé que 1/5 des GCc étaient associées à la membrane (Zabel et al., 2002). De plus, l'étude de Venema (Venema et al., 2003), a démontré que dans les CEs, les GCc sont majoritairement associées à la membrane alors que dans les CMLVs, les GCs sont cytosoliques.

Les GCc peuvent être soumises à des modes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. En effet l'expression des transcrits des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  peut être diminuée suite à l'exposition aux œstrogènes (Krumenacker et al., 2001), aux agents élevateurs de l'AMPc (Papapetropoulos et al., 1995) et certaines cytokines (Papapetropoulos et al., 1996). L'activité des GCc peut être modulée par phosphorylation par les kinases PKA, PKG et PKC, données confirmées *in vitro* sur des extraits de GCc purifiés (Zwiller et al., 1981, 1985). La phosphorylation par PKA et PKC semblent être activatrice (Zwiller et al., 1981, 1985) tandis que celle de PKG semble être inhibitrice (Zwiller et al., 1985).

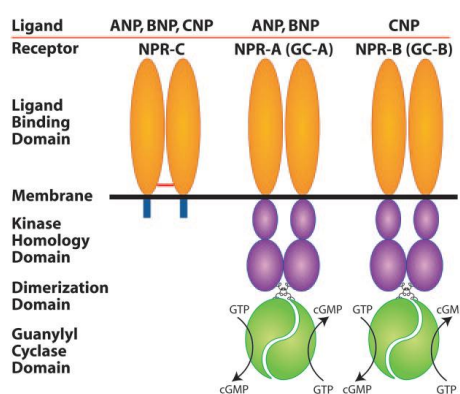
#### **2.2.1.2. Les guanylates cyclases particulières**

Les peptides natriurétiques représentés par le peptide natriurétique atrial, ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*), le peptide natriurétique B, BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) et le peptide natriurétique C constituent une famille de polypeptides d'origine essentiellement cardiaque, ayant un effet natriurétique et vasodilatateur (Potter et al., 2006). L'ANP est sécrété par les myocytes des oreillettes lors de leur distension. Le BNP, bien que découvert initialement dans le cerveau est aussi largement sécrété par les myocytes des ventricules en réponse à un étirement. Le CNP est formé dans le cerveau et l'endothélium vasculaire. Ils sont sécrétés sous forme de précurseur puis activés par clivage enzymatique. Les peptides natriurétiques exercent

leurs effets physiologiques en se fixant sur leurs récepteurs, les guanylates cyclases particulières (GCp) (Potter et al., 2006).

Cinq types de GCp ont été identifiées chez l'homme : deux récepteurs lient les peptides intestinaux guanyline et uroguanyline, trois autres récepteurs lient les peptides natriurétiques ; il s'agit des récepteurs NPR-A (liant l'ANP et le BNP), NPR-B (liant le CNP uniquement) et NPR-C (pouvant lier les 3 peptides natriurétiques). Ils sont aussi appelés GC-A, GC-B et récepteur de clairance ou NPR1, NPR2 et NPR3 respectivement. Les récepteurs NPR-A, NPR-B portent une activité guanylate cyclase intrinsèque tandis que le NPR-C est dépourvu d'activité enzymatique (Potter et al., 2006), mais est couplé à une protéine  $G_i$ .

Les NPR-A et NPR-B sont des protéines transmembranaires qui s'associent en homodimère. Chaque monomère est constitué d'une partie extracellulaire et d'une autre intracellulaire, reliées par une courte séquence transmembranaire de 21 - 25 acides aminés. La partie extracellulaire assure l'interaction avec le ligand. La partie intracellulaire est constituée de trois domaines : un domaine juxtamembranaire homologue à celui des kinases (*kinase like homology domain* ou KHD intracellulaire mais non fonctionnel), un domaine de dimérisation et enfin un domaine catalytique à l'extrémité N-terminale (Kuhn, 2003) (Figure 13). La liaison du ligand au domaine extracellulaire, induit un changement de conformation (dimérisation) qui active le domaine catalytique et permet la synthèse du GMPc. Le NPR-C a un domaine extracellulaire similaire à celui du NPR-A et NPR-B mais il est dépourvu du domaine KHD et du domaine catalytique. Ce récepteur est responsable de la clairance des peptides natriurétiques (Kuhn, 2003).



**Figure 13 : Représentation schématique de la structure des NPR d'après (Potter et al., 2006).**

La structure du NPR-A (liant l'ANP et le BNP) et NPR-B (liant de CNP) se compose d'une partie extracellulaire liant le ligand, un domaine juxtamembranaire KHD, un domaine de dimérisation et un domaine catalytique. Le NPR-C liant les trois peptides natriurétiques est exclusivement constitué d'un domaine extracellulaire.

A l'exception du NPR-C dont l'expression est ubiquitaire, le NPR-A semble très exprimé dans le système cardiovasculaire et les organes métaboliques. Le NPR-B est aussi retrouvé dans le système cardiovasculaire avec en plus une localisation dans les organes de reproductions et la moelle osseuse (Kuhn, 2003).

L'exposition prolongée à l'agoniste peut conduire à la désensibilisation des NPR, due au changement de l'état de phosphorylation du domaine KHD du récepteur (Schröter et al., 2010).

### **2.2.2. Les protéines kinases G, protéines effectrices du GMPc**

La PKG appartient à la famille des sérine/thréonine kinases, homologue de la PKA mais activée par le GMPc. Elle n'est formée que de deux sous-unités, identiques, chacune comprenant un site catalytique et deux sites de fixation du GMPc. La PKG présente deux isoformes, I et II, codées respectivement par deux gènes, *PKG1* et *PKG2*. PKGI est cytosolique alors que PKGII serait localisée à la membrane (Hofmann et al., 2009).

PKGI est très exprimée dans les CML et les neurones tandis que la PKGII se trouve essentiellement dans les cellules épithéliales de l'intestin, les cellules juxta-glomérulaires, le cortex surrénal et dans les chondrocytes (Hofmann et al., 2009). L'épissage alternatif du gène PKGI génère deux variants PKGI $\alpha$  et PKGI $\beta$ . PKGI $\alpha$  est très exprimé dans le cervelet et le poulmon alors que PKGI $\beta$  prédomine dans les CMLVs (Schlossmann and Hofmann, 2005). L'ensemble des isoformes PKGI et PKGII constitue des cibles privilégiées du GMPc mais seul l'isoforme PKGI a été associée à un effet vasorelaxant (Hofmann et al., 2009) c'est pourquoi nous nous focaliserons sur la description de cette isoforme.

PKGI $\alpha$  peut être activée par des concentrations de GMPc dix fois moins importantes que celle nécessaire pour activer PKGI $\beta$ . Cependant les deux isoformes phosphorylent leurs substrats avec la même affinité (Francis et al., 2010). Au niveau du muscle lisse vasculaire, PKGI phosphoryle des cibles des protéines intracellulaires mais contrairement à la PKA qui est associée à une protéine d'ancrage AKAP, la PKGI interagirait directement avec ces cibles intracellulaires. En effet, l'étude de (Schlossmann et al., 2000) a révélé par l'utilisation de la technique d'immunoprécipitation sur des lysats d'aorte et de trachée d'origine bovine, que la PKGI $\beta$  interagissait directement avec l'IP3R et sa protéine modulatrice IRAG. L'utilisation des techniques d'immunoprécipitation et d'immunomarquage dans l'étude de Surs (Surks et al., 1999) a rapporté que la PKGI $\alpha$  interagissait physiquement avec la sous-unité régulatrice de la MLCP, MYPT1 dans des cultures de cellule issues de veine saphène humaine.

De nombreuses études ont démontré le rôle essentiel de la PKGI dans le contrôle du tonus vasculaire. En effet, elle est impliquée dans les réponses relaxantes dans divers lits vasculaires incluant l'aorte, l'artère mésentérique, l'artère pulmonaire et l'artère coronaire (Carrier et al., 1997; Satake et al., 1996; White et al., 1995). De manière intéressante, la suppression de l'expression de la PKGI chez la souris provoque le développement d'une hypertension, ce qui vient renforcer le rôle crucial de la PKGI dans la régulation du tonus vasculaire (Pfeifer et al., 1998).

### **2.3. Hydrolyse des NCs par les phosphodiesterases**

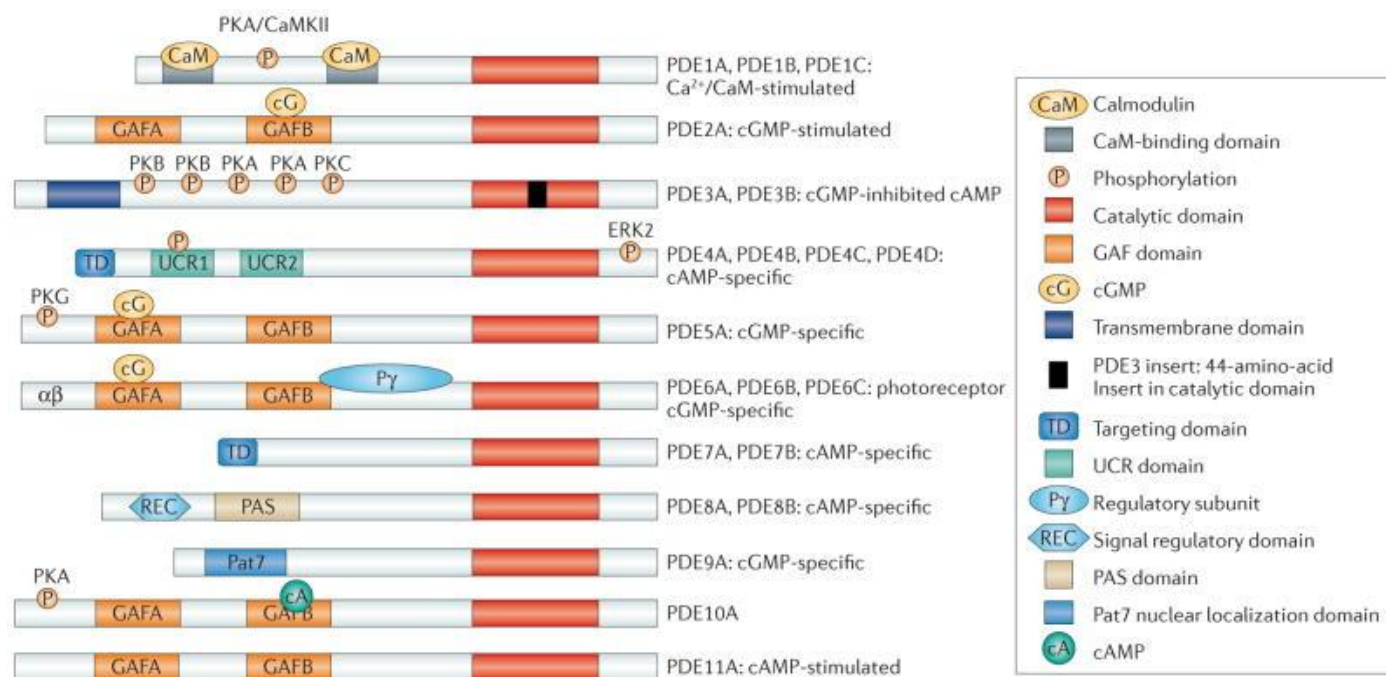
Les PDEs sont une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse du 3',5'-AMPc et/ou du 3',5'-GMPc en une forme inactive 5'-AMP et 5'-GMP, respectivement (Conti and Beavo, 2007; Francis et al., 2010; Lugnier, 2006a). Chez les mammifères, 11 familles de PDEs ont été répertoriées sur la base de leur structure protéique, leurs propriétés enzymatiques, leur mode de régulation, et leurs propriétés pharmacologiques (Tableau 2). Trois familles hydrolysent sélectivement l'AMPc (PDE 4, 7 et 8), trois autres sont sélectives du GMPc (PDE5, 6 et 9) et les autres familles sont non sélectives de l'AMPc et GMPc (PDE1, 2, 3, 10 et 11) (Komas et al., 1991; Lugnier, 2006a).

Actuellement, 21 gènes ont été identifiés, codant pour 54 isoformes issues d'épissage alternatif. Toutes les PDEs possèdent un domaine catalytique hautement conservé localisé dans la portion C-terminale de la protéine. Ce domaine présente 25 à 52% d'homologie de séquence en acides aminés d'une famille à l'autre (Lugnier, 2006a; Maurice et al., 2014a; Omori and Kotera, 2007a) les PDEs se distinguent par leur région N-terminale possédant un domaine régulateur propre à chaque famille. Ce domaine régule l'activité catalytique et la localisation subcellulaire de la protéine. Il peut également contenir des sites de phosphorylation, de dimérisation, ou d'adressage (Figure 14) (Beavo et al., 2006; Conti and Beavo, 2007; Lugnier, 2006a; Maurice et al., 2014a; Omori and Kotera, 2007a). Ainsi, ce domaine régulateur se caractérise pour la famille PDE1 par deux domaines de liaison au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ; pour les familles PDE2, 5, 6, 10 et 11, par des domaines de liaison au GMPc appelés domaines GAF pour *cGMP-binding PDEs*, *adenylate cyclase*, *fh1A* ; pour la PDE4, des régions conservées appelées UCR pour *upstream conserved regions* ; et pour la PDE8, par un domaine PAS pour *period, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, single minded* (Lugnier, 2006a; Maurice et al., 2014a; Omori and Kotera, 2007a).

L'expression de certaines PDEs est limitée à quelques tissus (PDE6, PDE9, PDE10) tandis que pour d'autre, l'expression est plus large. L'existence dans un même tissu de nombreuses isoformes possédant des propriétés régulatrices, catalytiques et des localisations différentes garantit l'hétérogénéité de la cinétique et de la répartition spatiale des nucléotides cycliques, et leur procure ainsi une grande diversité d'action dans des processus cellulaires variés. En effet, il a été rapporté que différentes isoformes de PDEs peuvent jouer des rôles distincts dans un même type cellulaire et créer ainsi une compartimentation subcellulaire de la voie de l'AMPC avec des « pools » d'AMPC localisés régulant des effecteurs distincts (Mika et al., 2012).

Au niveau des CMLV et des CEs, quatre familles de PDEs hydrolysant l'AMPC sont classiquement décrites pour avoir un rôle fonctionnel. Il s'agit des PDE1, 2, 3 et 4. Seule l'expression des transcrits a été rapportée pour les PDE7, 8 et 9 et l'absence d'outils pharmacologiques sélectifs a limité l'exploration de leur rôle au niveau vasculaire. Pour ce qui est de la PDE 10, elle ne semble pas exprimée au niveau vasculaire. Le GMPc est quant à lui principalement hydrolysé par la PDE5 et potentiellement par la PDE1, 2 et 3 (Lugnier, 2006b; Omori and Kotera, 2007a).

Dans notre projet, nous nous sommes intéressés en particulier aux familles de PDE2, PDE3 et PDE4 dont je détaillerai ci-après les principales caractéristiques.



**Figure 14 : Représentation schématique des 11 familles de PDE d'après (Maurice et al., 2014b).**

Le domaine catalytique situé dans la partie C-terminale est représenté en rouge. Il présente 25 à 52% d'homologie de séquence en acides aminés entre les différentes familles. Le domaine

régulateur, située dans la partie N-terminale est compte à lui spécifique de chaque famille. Les isoformes de PDE composant chaque famille ainsi que leurs caractéristiques sont indiquées à droite.

| Famille       | Isoforme | Localisation sur le chromosome | Substrat     | K <sub>m</sub> (μmol/L) | Voie de régulation             | Expression tissulaire                                   |
|---------------|----------|--------------------------------|--------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>PDE1</b>   | PDE1A    | 2q32.1                         | AMPc<br>GMPc | 73-120<br>2,6-5         | Complexe Ca <sup>2+</sup> -CaM | Cerveau, CML, cœur, testicules                          |
|               | PDE1B    | 12q13                          | AMPc<br>GMPc | 10-24<br>1,2-5,9        |                                |                                                         |
|               | PDE1C    | 7p15.1<br>p14.3                | AMPc<br>GMPc | 0,3-1,2<br>0,6-2,2      |                                |                                                         |
| <b>PDE2</b>   | PDE2A    | 11q13.4                        | AMPc<br>GMPc | 30-50<br>10-30          | Stimulée par le GMPc           | Cortex surrénale, cerveau, cœur, CE                     |
| <b>PDE 3</b>  | PDE3A    | 12p12                          | AMPc         | 0,02-0,15               | Inhibée par le GMPc            | Cœur, CML, plaquettes<br>tissu adipeux                  |
|               | PDE3B    | 11p15.1                        | GMPc         | 0,18                    |                                |                                                         |
| <b>PDE4</b>   | PDE4A    | 19p13.2                        | AMPc         | 2,9-10                  | Spécifique de l'AMPc           | ubiquitaire                                             |
|               | PDE4B    | 1p31                           |              |                         |                                |                                                         |
|               | PDE4C    | 19p13.11                       |              |                         |                                |                                                         |
|               | PDE4D    | 5q12                           |              |                         |                                |                                                         |
| <b>PDE5</b>   | PDE5A    | 4q25-q27                       | GMPc         | 1-6,2                   | Spécifique du GMPc             | CML, plaquettes, cervelet                               |
| <b>PDE6</b>   | PDE6A    | 5q31.2-q34                     | GMPc         | 15-17                   | Couplé à un photorécepteur     | Rétine                                                  |
|               | PDE6B    | 4p16.3                         |              |                         |                                |                                                         |
|               | PDE6C    | 10q24                          |              |                         |                                |                                                         |
| <b>PDE7</b>   | PDE7A    | 8q13                           | AMPc         | 0,1-0,2                 |                                | Muscle squelettique, cellules immunitaires, cerveau     |
|               | PDE7B    | 6q23-q24                       |              |                         |                                |                                                         |
| <b>PDE8</b>   | PDE8A    | 15q25.3                        | AMPc         | 0,04-0,06               | Spécifique de l'AMPc           | Cellules immunitaires, foie, rein, testicules, thyroïde |
|               | PDE8B    | 5q14.1                         |              |                         |                                |                                                         |
| <b>PDE9</b>   | PDE9A    | 21q22.3                        | GMPc         | 0,17-0,39               | Spécifique du GMPc             | Cerveau, rein                                           |
| <b>PDE 10</b> | PDE10A   | 6q26                           | AMPc<br>GMPc | 0,26<br>7,2             | Inhibée par l'AMPc             | Cerveau, testicules                                     |
| <b>PDE 11</b> | PDE11A   | 2q31.2                         | AMPc<br>GMPc | 1.04-5,7<br>0,52-4,2    | Spécificité AMPc = GMPc        | Prostate, testicules, muscle squelettique               |

**Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques des PDEs d'après (Omori and Kotera, 2007a).**

### 2.3.1. La PDE2

#### 2.3.1.1. Caractéristiques générales

C'est en 1971 que Beavo (Beavo et al., 1971) découvre l'existence d'une nouvelle famille de PDE activée par le GMPc. En effet, par l'addition de ce NC dans des divers extraits tissulaires (foie, cerveau, rein, cœur et thymus), il a constaté une augmentation de l'hydrolyse de l'AMPc. Cette famille de PDE a été initialement appelée PDE GMPc –stimulée puis identifiée comme la famille de PDE2.

La PDE2 est codée par un unique gène dont l'épissage alternatif génère 3 variants : *PDE2A1*, *PDE2A2* et *PDE2A3*, partageant la même séquence C-terminale. Cependant ils diffèrent par leur région N-terminale, responsable de leur localisation subcellulaire spécifique. Le variant *PDE2A1* est de localisation cytosolique, alors que les deux autres variants sont de localisation particulaire. Le domaine N-terminal possède deux sites de liaison du GMPc, GAF-A et GAF-B (Lugnier, 2006a; Omori and Kotera, 2007a).

La PDE2 établit le lien entre deux voies de signalisation, celle de l'AMPc et du GMPc. En effet, elle est capable d'hydrolyser les deux nucléotides cycliques (Tableau 2) (Martins et al., 1982).

Lorsque le GMPc se lie au domaine allostérique GAF de la PDE2, il entraîne un changement conformationnel de l'enzyme contribuant à l'augmentation de son activité hydrolytique pour l'AMPc, jusqu'à 30 fois dans des conditions *in vitro* et 6 fois dans les conditions physiologiques (Heikaus et al., 2009). Le domaine GAF-B possède 30 à 100 fois plus d'affinité pour le GMPc que pour l'AMPc (Bender and Beavo, 2006).

Bien que de faibles niveaux d'activité PDE2 aient été détectés dans des vaisseaux dénudés de leur endothélium (Saeki and Saito, 1993a), son expression au niveau vasculaire est classiquement décrite pour être endothéliale. En effet, chez l'homme, la PDE2 a été identifiée dans l'endothélium des veines et capillaires tandis que les sections artérielles ne semblent pas exprimer cette protéine (Sadhu et al., 1999). Cette différence pourrait être expliquée par le faible niveau d'expression, non détectable dans les artères ou par la différence de phénotype entre les lits vasculaires. La PDE2 est aussi retrouvée dans les CEs d'origine bovine et porcine avec des niveaux d'expressions différents *in situ* ou en culture (Maurice et al., 2003).

#### 2.3.1.2. Modulation pharmacologique de l'activité PDE2

Des outils pharmacologiques ont permis d'explorer le rôle fonctionnel de la PDE2 dans les systèmes physiologiques qui l'expriment. Le premier inhibiteur décrit est l'EHNA (érythro-9-



(2-hydroxy-3-nonyl) adénine) (Méry et al., 1995). L'EHNA présente une IC<sub>50</sub> de 800 nM pour la PDE2 humaine (>100 µM pour les autres isoformes de PDEs). Toutefois, l'EHNA présente l'inconvénient d'être peu sélectif car il inhibe aussi l'adénosine désaminase (Schaeffer and Schwender, 1974).

Par la suite, de nouveaux inhibiteurs plus sélectifs ont été développés comme :

- L'oxindole avec une IC<sub>50</sub> de 40 nM (Chambers et al., 2006).
- L'IC933 avec une IC<sub>50</sub> de 4 nM (Snyder et al., 2005).
- Le PDP (9-(6-phenyl-2-oxohex-3-yl)-2-(3,4 dimethoxybenzyl)- purin-6- one) avec une IC<sub>50</sub> de 0,6 nM (Dunkern and Hatzelmann, 2005).
- le BAY 60-7550 (2-[(3,4-dimethoxyphenyl) methyl]-7-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-phenylbutyl]-5-methylimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4(1H)-one) inhibe la PDE2A bovine avec une IC<sub>50</sub> de 2 nM et la PDE2 recombinante humaine avec une IC<sub>50</sub> de 5 nM. Le ratio de sélectivité par rapport à la PDE1 est de 50 alors qu'il est de l'ordre de 100 pour les autres membres de la famille PDEs (Boess et al., 2004). Actuellement, seuls le BAY 60-7550, et l'EHNA sont disponibles commercialement.

### **2.3.1.3. Rôle de la PDE2 dans la régulation du tonus vasculaire**

Le rôle de la PDE 2 dans la régulation du tonus vasculaire a été très peu étudié en raison de sa faible expression et activité dans les CMLVs. Une étude récente réalisée par l'équipe de Hobbs (Bubb et al., 2014), s'est intéressée au rôle de la PDE2 dans la régulation de la vasomotricité de l'artère pulmonaire isolée de rat, dans le contexte d'hypertension pulmonaire. Il a été constaté que l'inhibition pharmacologique de la PDE2 par de fortes doses de BAY 60-7550 induisait une réponse relaxante. Les expériences ont été réalisées sur des artères pulmonaires isolées du groupe de rat atteint d'hypertension pulmonaire (induite par l'hypoxie, en présence de 10% d'O<sub>2</sub> pendant 2 semaines) et de leur groupe contrôle. Dans le groupe témoin, le BAY 60-7550, a potentialisé la réponse relaxante de l'ANP et à un donneur de NO (spermine NONOate) tandis que dans le groupe d'animaux malades, la potentialisation de la réponse à l'ANP est conservée. Ces résultats indiquent que la contribution de la PDE2 dans la régulation de la réponse relaxante médiée par le GMPc est altérée dans l'hypertension pulmonaire. De plus, l'étude de Haynes (Haynes et al., 1996) réalisée en *ex vivo* sur poumon isolé de rat perfusé avec un mélange de gaz enrichi en CO<sub>2</sub> révèle que l'inhibition de la PDE2 par l'EHNA diminue la réponse vasoconstrictrice suite à une hypoxie pulmonaire.

Par ailleurs, il a été suggéré que la PDE2 régule certains traits de la fonction endothéliale. En effet, son expression semble augmentée lors de la prolifération des CE en culture (Keravis et

al., 2000) et en présence de VEGF (Favot et al., 2004) suggérant son rôle dans le phénomène d'angiogenèse. De manière intéressante, des données *in vivo* sur des explants d'aorte de souris révèle que l'inhibition de la PDE2 préviendrait l'angiogenèse (Diebold et al., 2009).

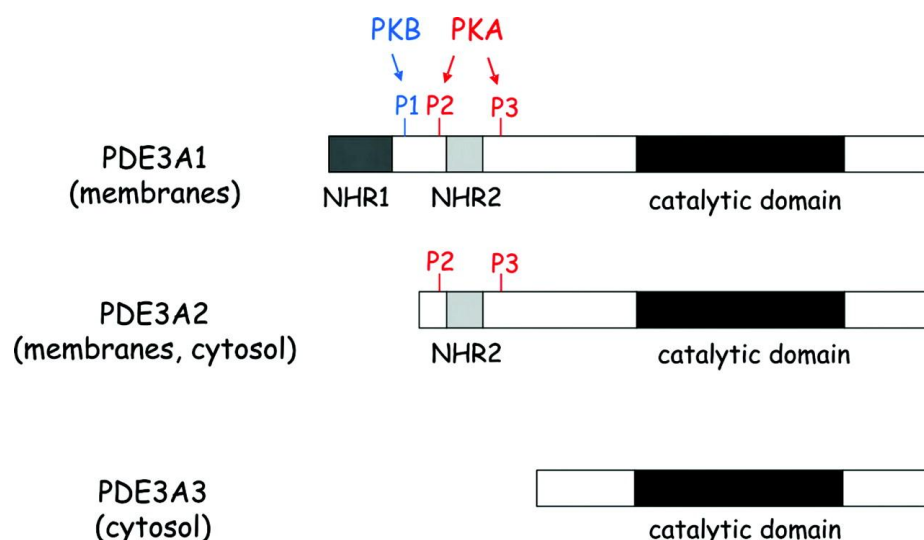
## **2.3.2. La PDE3**

### **2.3.2.1. Caractéristiques générales**

La famille des PDE3 est codée par 2 gènes différents, *PDE3A* qui code pour 3 isoformes (PDE3A1-3) et *PDE3B* qui code pour une seule isoforme (Lugnier, 2006b; Omori and Kotera, 2007a). Les PDE3 ont la particularité de posséder un insert de 44 acides aminés au niveau du domaine catalytique C-terminal, qui semble jouer un rôle important dans la sensibilité de l'enzyme au GMPc et à l'inhibition sélective de ces enzymes (He et al., 1998; Manganiello and Degerman, 1999). Leur activité enzymatique peut être stimulée suite à une élévation de la concentration d'AMPc intracellulaire dans différents types cellulaires tel que les CMLs d'aorte humaine ou rat en culture (Liu and Maurice, 1998).

Les isoformes possèdent dans leur région N-terminale des sites NHR pour *N-terminal hydrophobic region*, responsables de leur adressage intracellulaire ciblé ce qui pourrait contribuer à la compartimentation du signal AMPc (Wechsler et al., 2002). Comme l'isoforme PDE3A1 contient deux domaines NHR1 et NHR2, sa localisation est exclusivement membranaire. L'isoforme PDE3A2 ne contient que le domaine NHR2, sa localisation est donc mixte, à la fraction membranaire et cytosolique (Maurice et al., 2003). L'isoforme PDE3A3 dépourvue des domaines NHR se retrouve exclusivement dans le cytosol. Et enfin, l'isoforme PDE3B possédant un domaine NHR1 plus long que celui de la PDE3A1 a été décrit pour être associé à la membrane (Yan et al., 2007) (Figure 15).

Toutes les isoformes de la famille des PDE3 possèdent des sites de phosphorylation (Figure 15), à l'exception de la PDE3A3 (Wechsler et al., 2002). Les PDE3A1 et PDE3B peuvent être phosphorylé par la PKA et la protéine kinase B (PKB) alors que la phosphorylation de la PDE3A2 se fait exclusivement par la PKA (Rondinone et al., 2000). La phosphorylation permet l'activation des PDE3 et par conséquent, une diminution des concentrations d'AMPc.



**Figure 15 : Représentation schématique de la structure et des voies de régulation des isoformes de PDE3 d'après (Zaccolo and Movsesian, 2007).**

La structure des isoformes de PDE3 diffère par la présence ou l'absence du domaine NHR (*Nterminal hydrophobic region*), et de sites de phosphorylation par la PKA et la PKB : P1, P2, P3.

La PDE 3 permet l'interaction entre les voies de signalisations des deux nucléotides cycliques car elle a la capacité d'hydrolyser l'AMPc et le GMPc (Tableau 2). Les deux NCs sont en compétition pour le même site catalytique. D'autre part, la PDE3 présente une  $V_{max}$  4 à 10 fois supérieure pour l'AMPc (Lugnier, 2006b). L'hydrolyse de l'AMPc par la PDE3 est donc inhibée par le GMPc. Cette particularité aurait des conséquences importantes sur le rôle vasculaire de la PDE3. En effet, son activité sera plus importante en cas de faible intensité de la voie GMPc dans la CML. L'activité de la PDE3 pourrait ainsi être exacerbée par une diminution de la biodisponibilité du NO d'origine endothélial, principal stimulateur de la voie GMPc dans les vaisseaux (Eckly and Lugnier, 1994; Eckly et al., 1994; Komasa et al., 1991).

La PDE3A est principalement présente dans le cœur, les plaquettes, les oocytes et les CMLs alors que la PDE3B est particulièrement exprimée dans les adipocytes, les hépatocytes, le rein et les spermatozoïdes (Reinhardt et al., 1995). Les CMLVs humaine, porcine et de rat, expriment tous les isoformes de la PDE3 (Polson and Strada, 1996). La PDE3A semble être la forme prédominante dans la fraction cytosolique tandis que la PDE3B est limitée à la fraction particulaire (Liu and Maurice, 1998; Palmer and Maurice, 2000). Cette différence de distribution intracellulaire, souligne le rôle de ces deux familles dans la régulation de fonctions cellulaires différentes et suggère la compartimentation du signal AMPc au niveau vasculaire. L'expression des isoformes de la PDE3 peut être modulée par divers agents pharmacologiques administrés *in vivo*. Une administration prolongée de nitrate chez le rat augmente l'expression

de la PDE3A1 dans CMLVs d'aorte (Kim et al., 2001). Un traitement prolongé par des agents élévateur de la concentration d'AMPc stimule l'expression des isoformes PDE3A2 et PDE3B dans l'aorte et l'artère fémorale de rat (Tilley and Maurice, 2002).

### **2.3.2.2. Modulation pharmacologique de l'activité PDE3**

Des inhibiteurs de la PDE3 sont disponibles sur le marché. Certains ont un usage thérapeutique.

- L'amrinone (Inocor®) et la milrinone (Primacor®) ( $IC_{50} = 150$  nM) sont des pyridines utilisés pour leur propriété cardiotonique dans le traitement de l'IC congestive en aigu. Le traitement chronique de patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère a cependant révélé une augmentation de la mortalité due aux arythmies et aux arrêts cardiaques (Movsesian and Kukreja, 2011; Packer et al., 1991).
- Le cilostazol (Pletal®) ( $IC_{50} = 20$  nM) est un dérivé des quinolones, utilisé pour ses propriétés vasodilatatrices et anti-agrégante (en inhibant la recapture de l'adénosine) dans le traitement d'une artériopathie ischémique des membres inférieurs, la claudication intermittente (Kanlop et al., 2011; Liu et al., 2011).
- L'usage des autres inhibiteurs comme le cilostamide, et l'OPC-33540 reste uniquement expérimental. Le cilostamide inhibe la PDE3A avec une  $IC_{50} = 27$  nM et la PDE3B avec une  $IC_{50} = 50$  nM (Sudo et al., 2000a). L'OPC-33540 inhibe préférentiellement la PDE3A ( $PDE3A$   $IC_{50} = 0,32$  nM,  $PDE3B$   $IC_{50} = 1,5$  nM) (Sudo et al., 2000a). Les tests *in vitro* réalisés sur des PDEs recombinante d'origine différente (humaine, bovine, rat) montrent que ces deux inhibiteurs sont sélectifs pour la famille PDE3 (ratio de sélectivité  $> 100$  pour PDE1, 2, 4, 5, 7) (Sudo et al., 2000a).

### **2.3.2.3. Rôle de la PDE3 dans la régulation du tonus vasculaire**

Des dosages *in vitro* de l'activité hydrolytique des PDEs réalisés dans des tissus vasculaires, en présence d'1  $\mu$ M d'AMPc, révèlent que la famille de PDE3 possède l'activité majoritaire (Hubert et al., 2014; Polson and Strada, 1996). D'autre part, l'importance fonctionnelle de cette famille de PDE sur le contrôle de la vasomotricité a notamment été démontrée dans plusieurs lits vasculaires par la réalisation d'expérience de réactivité vasculaire *ex-vivo*, en présence d'inhibiteur sélectif de la PDE3.

Actuellement, il est clairement établi que l'inhibition pharmacologique de la PDE3 induit, d'une part une réponse relaxante dans plusieurs lits vasculaires comme l'artère mésentérique humaine (Lindgren et al., 1989), l'aorte de rat (Lindgren and Andersson, 1991a) ainsi que les artères coronaires, pulmonaires et rénales humaine et leur équivalent chez le rat (Lindgren and

Andersson, 1991b). Sur des anneaux d'aorte de rat pour lesquels l'endothélium a été détérioré, l'effet vasorelaxant est préservé (Eckly et al., 1994; Komasa et al., 1991). D'autre part, l'inhibition de la PDE3 s'oppose à la réponse contractile induite soit par la stimulation spécifique d'un RCPG, soit par dépolarisation à l'aide d'une solution physiologique enrichie en  $K^+$  ( $[K^+] = 80 \text{ mM}$ ) (Meisheri et al., 1980). De plus, une potentialisation des réponses relaxantes à des agents responsable de l'augmentation de  $[AMPc]_i$  et du  $[GMPc]_i$  a également été observée en présence d'inhibiteur de la PDE3 (Komasa et al., 1991; Lindgren and Andersson, 1991b; Maurice and Haslam, 1990).

Bien que ces effets vasorelaxants puissent être expliqués par l'augmentation de la concentration d'AMPc résultant de l'atténuation de son hydrolyse par la PDE3 (Eckly et al., 1994; Lindgren et al., 1991a), il est nécessaire de souligner l'implication du GMPc dans les effets précédemment observés. La présence d'un endothélium fonctionnel et l'utilisation d'agents activateurs des GCc (donneurs de NO, ANP) contribuent à l'augmentation de la concentration de GMPc, connue pour réguler négativement l'activité de la PDE3. L'augmentation de la concentration de GMPc dans les CMLVs permet une action synergique avec les agents élévateurs de la concentration d'AMPc (isoprénaline et forskoline) pour potentialiser leur effet vasorelaxant. Donnée confirmée par l'étude de Maurice (Maurice et al., 1991) réalisée dans l'aorte de rat. En effet cette étude rapporte une potentialisation de l'effet du cilostamide en présence d'isoprénaline et d'un donneur de NO, le nitruressiate de sodium.

Bien que ce mécanisme soit identique à celui décrit dans les cardiomyocytes, l'expression de la PDE2 au niveau vasculaire est faible en comparaison à la PDE3 ce qui par conséquent, sous-entend que le GMPc exerce globalement un effet inhibiteur sur l'activité PDE3 plutôt que stimulateur de l'activité PDE2.

L'utilisation de souris déficiente pour l'isoforme PDE3A et PDE3B a permis de mettre en évidence l'implication spécifique de l'isoforme PDE3A, sans la PDE3B, dans la prolifération des CMLVs. En effet, il a été constaté un blocage du cycle cellulaire dans les CMLVs issues des souris déficientes pour la PDE3A exclusivement. De plus, l'utilisation d'ARN interférant ciblant la PDE3A chez les souris déficientes pour la PDE3B a confirmé l'implication exclusive de l'isoforme PDE3A (Begum et al., 2011).

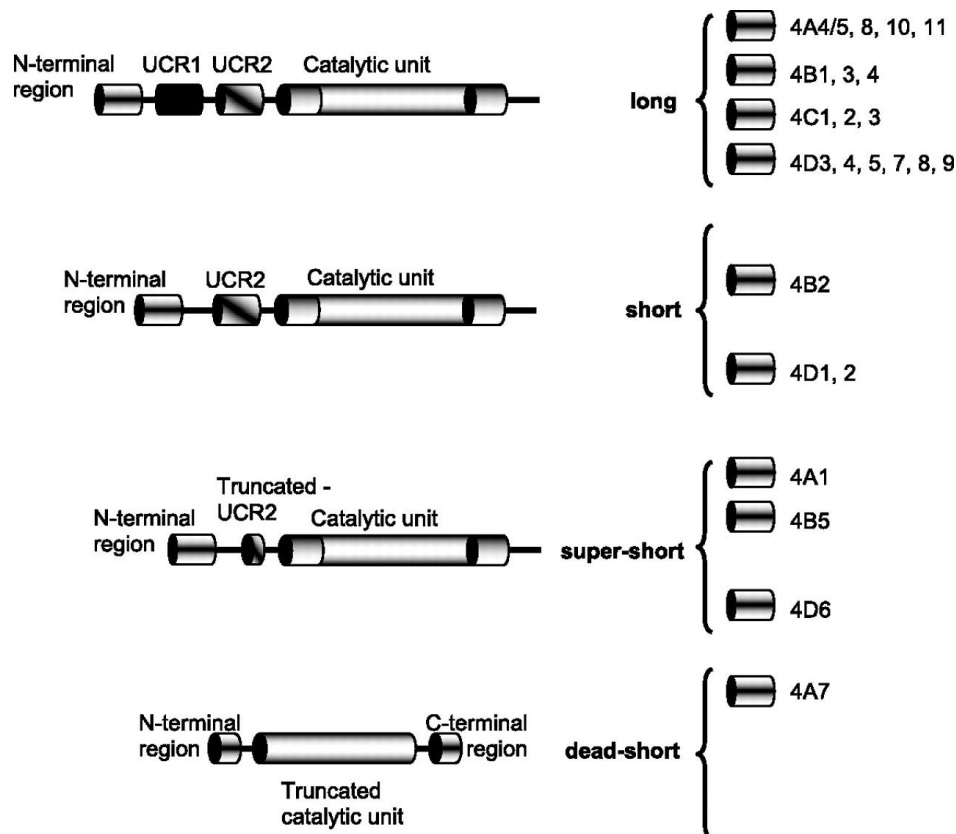
Dans l'endothélium vasculaire, la caractérisation des isoformes de PDE3 présents restent encore incomplète. Cependant, l'effet des inhibiteurs de PDEs dans les CEs est clairement défini. Ils réduisent la prolifération et l'expression des molécules d'adhésion des CEs (Blease et al., 1998; Lugnier and Schini, 1990; Suttorp et al., 1993). Le mécanisme mis en jeu semble impliquer un

complexe macromoléculaire adressé à la membrane des CEs et associant la PDE3 au facteur d'échange Epac1. Le détachement d'Epac1 du complexe permettrait son activation et provoque la formation de tubules et l'adhésion cellulaire (Wilson et al., 2011).

### 2.3.3. La PDE4

#### 2.3.3.1. Caractéristiques générales

C'est une famille de PDE qui hydrolyse spécifiquement l'AMPc. Elle comprend quatre isoformes (PDE4A, PDE4B, PDE4C et PDE4D) codées par 4 gènes différents. L'épissage alternatif des produits d'expression de ces gènes génèrent de plus une multitude de variants, répartis en formes courtes ou longues (Komas et al., 1991; Lugnier, 2006b). Si les formes longues de PDE4 contiennent dans leur région N-terminale deux domaines conservés (*Upstream Conserved Regions*), UCR-1 et UCR-2, les formes courtes ou super-courtes présentent seulement le domaine UCR-2 respectivement complet ou tronqué (Figure 16). Le domaine catalytique est situé dans la région C-terminale (Figure 16).



**Figure 16 : Représentation schématique de la structure des 4 groupes de PDE4 d'après (Houslay et al., 2007).**

Les isoformes de PDE4, résultant de l'épissage alternatif de 4 gènes différents (PDE4A, 4B, 4C et 4D), sont classées en 4 groupes en fonction de la taille de leur région N-terminale : les formes

longues, les formes courtes, les formes super-courtes et les formes mortes-courtes. UCR : *Upstream Conserved Region*.

Les domaines UCR sont aussi le siège d'interaction avec diverses protéines comme la protéine AKAPs,  $\beta$ -arrestine, ERK et RACK. Ces interactions permettent une localisation spécifique des variants de PDE4 dans des compartiments subcellulaires (Houslay et al., 2005).

Les PDE4 peuvent être phosphorylées par la PKA, la protéine ERK et la CAMKII (Maurice et al., 2003; Mika et al., 2015). Les formes longues sont sélectivement phosphorylées par la PKA entraînant leur activation, tandis que la phosphorylation par ERK est inhibitrice. Les formes courtes quant à elle sont activées par phosphorylation par la protéine ERK (Maurice et al 2003).

L'expression des isoformes de la PDE4 est ubiquitaire. L'isoforme PDE4A est très exprimée dans le cerveau, quant aux isoformes PDE4B et PDE4D, ils prédominent dans les cellules du système immunitaire (Omori and Kotera, 2007a). Au niveau cardiaque, trois isoformes sont exprimés PDE4A, PDE4B (PDE4B1, PDE4B2, et PDE4B3), and PDE4D (PDE4D1, PDE4D2 et PDE4D3) (Maurice et al., 2003). Au niveau vasculaire, les CMLVs isolées de divers lits vasculaires chez l'homme et le rat expriment le variant PDE4B2 ainsi que de nombreux variants de PDE4D (PDE4D3, PDE4D5, PDE4D7, PDE4D8 et PDE4D9). L'expression et l'activité des variants PDE4D est décrite pour être sensible aux agents éleveurs de la concentration d'AMPc. Un court traitement (2-30 min) entraîne l'activation des isoformes PDE4D3 et PDE4D5 suite à leur phosphorylation par la PKA. Une exposition plus longue (1-4 h) stimule l'expression de la PDE4D3 dans les artères fémorales isolées de rat (Maurice et al, 2003).

#### **2.3.3.2. Modulation pharmacologique de l'activité de PDE4**

Le rolipram et le Ro-20-1724 furent les premiers inhibiteurs sélectifs de la PDE4 développés (Lugnier et al., 1983; Schwabe et al., 1976). Ils inhibent tous les isoformes de PDE4 avec des  $IC_{50}$  relativement proches ( $IC_{50} = 0,05-2 \mu M$  pour le rolipram et  $IC_{50} = 1-2 \mu M$  pour le Ro-20-1724) (Rich et al., 2001). La propriété anti-inflammatoire du rolipram a encouragé le développement de nouveaux inhibiteurs pour le traitement de certaines maladies inflammatoires comme la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) et l'asthme. Ces deux pathologies sont caractérisées par inflammation chronique du muscle lisse bronchique. Un obstacle majeur au développement clinique des inhibiteurs de PDE4 est lié à leurs effets indésirables. Les inhibiteurs de PDE4 provoquent d'importants désordres gastro-intestinaux (nausées, vomissements et diarrhées). C'est pourquoi les efforts de l'industrie pharmaceutique se sont focalisés par la suite sur la réduction de ces effets indésirables. Deux

inhibiteurs, le cilomast (Ariflo®,  $IC_{50} = 95 \text{ nM}$ ; (Christensen et al., 1998)) et le roflumilast (Daxas®,  $IC_{50} = 0,8 \text{ nM}$ ; (Hatzelmann & Schudt, 2001)) ont atteint la phase III des essais cliniques et sont commercialisés pour le traitement de la BPCO. Plus récemment, des inhibiteurs sélectifs pour l'isoforme PDE4D et PDE4B ont été synthétisés. Le GEBR-7b inhibe la PDE4D avec une  $IC_{50} = 0,67 \text{ } \mu\text{M}$  (Bruno et al., 2011) et le dérivé du 2-arylpurimidine inhibe la PDE4B avec une  $IC_{50} = 0,19 \text{ } \mu\text{M}$  (Naganuma et al., 2009). Seul le premier est commercialisé par la société Calbiochem (Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France). Les essais *in vivo* réalisés sur des souris, par comparaison au rolipram, révèlent qu'ils ont la capacité d'induire un effet pharmacologique (améliore la capacité de mémorisation chez le rat) à des doses qui n'entraînent pas d'effets indésirables (absence ou très peu de nausées) (Bruno et al., 2011).

### **2.3.3.3. Rôle de la PDE4 dans la régulation du tonus vasculaire**

La mesure *in vitro* de l'activité enzymatique de la PDE4, en présence d' $1 \text{ } \mu\text{M}$  d'AMPC, révèle que cette PDE, constitue après la PDE3, une des principales familles qui dégradent l'AMPC dans les CMLVs de plusieurs lits vasculaires (Hubert et al., 2014; Polson and Strada, 1996). Cependant, ces données ne reflètent pas vraiment les effets fonctionnels des inhibiteurs de PDE4 sur le tonus vasculaire. En effet, il est généralement admis que l'effet relaxant d'un inhibiteur de PDE4 est modéré (Lugnier, 2006b; Maurice et al., 2003), comme le montrent par exemple les expériences de réactivité vasculaires réalisées sur l'aorte de rat par l'équipe de Komasa et Lindgren (Komasa et al., 1991; Lindgren et al., 1990) et sur l'artère coronaire porcine (Kaneda et al., 2010). Par la suite, il a été constaté qu'en présence d'un inhibiteur de PDE3, d'un endothélium fonctionnel ou d'un donneur de NO, l'effet relaxant de l'inhibiteur de PDE4 est amplifié. Cette observation serait expliquée par la redondance des activités PDE3 et PDE4. En effet, ces conditions sont associées à une augmentation de la concentration de GMPc dans les CMLVs et inhiberaient la PDE3. La contribution relative à l'hydrolyse de l'AMPC par la PDE4 serait dans ce cas plus importante, et donc associée à un effet plus important des inhibiteurs de PDE4 (Eckly and Lugnier, 1994; Hubert et al., 2014; Komasa et al., 1991). Ces observations prouvent qu'il existe une interaction entre la PDE3 et la PDE4 contrôlée par le GMPc.

De façon comparable aux inhibiteurs de PDE3, les inhibiteurs de PDE4 réduisent la prolifération et l'expression des molécules d'adhésion et la perméabilité des CEs (Blease et al., 1998; Lugnier and Schini, 1990; Suttorp et al., 1993). Ces données ont été vérifiées expérimentalement *in vitro* et *in vivo* en utilisant le modèle de la membrane chorio-



allantoïdienne d'œufs aviaires fécondés (DeFouw and DeFouw, 2001). Le rôle spécifique de chaque isoforme reste à explorer.

Comme la PDE3, la PDE4D a été décrite pour former un complexe membranaire avec Epac1 qui a pour rôle la régulation de la perméabilité des CEs. Cette dernière est favorisée lors de la dissociation du complexe membranaire (Rampersad et al., 2010).

## **2.4. Efflux des NCs par les MRP**

La dégradation des NCs par les PDEs ne constituent pas le seul mécanisme permettant la diminution de leurs concentrations intracellulaires. Les NCs peuvent être extrudés des cellules via les transporteurs transmembranaire MRP (*Multidrug Resistance associated Protein* appartenant à la grande famille des transporteurs *ATP-binding cassette* (Borst et al., 1999). La MRP4 et MRP5 ont été identifiées pour prendre en charge l'AMPc et le GMPc pour l'effluer dans divers types cellulaire (Aubel et al., 2002; Jedlitschky et al., 2000) même dans les CMLVs d'artère coronaire et pulmonaire (Mitani et al., 2003).

Le rôle des MRP4 et MRP5 dans la régulation du tonus vasculaire est encore inconnu. Cependant, l'étude réalisée par Sassi (Sassi et al., 2008) révèle l'implication de la MRP4 dans la prolifération cellulaire. En effet, il a été constaté une surexpression de la MRP4 dans les CMLVs d'artère coronaire humaines après culture *in vitro* et de rat, suite à une lésion vasculaire *in vivo*. De plus, il a été constaté que l'inhibition pharmacologique de la MRP4 dans ces deux modèles cellulaires, inhibe la prolifération des CMLVs et préviendrait la formation de néointima après lésion vasculaire.

De plus, l'étude réalisée par Hara dans un contexte d'hypertension pulmonaire (HTAP) montre que l'inhibition de la MRP4 avait un effet antiprolifératif sur les CMLVs isolées de patients atteints d'HTAP. De même pour les CMLVs isolées d'un modèle murin d'HTAP induite par hypoxie. Ces résultats suggèrent que MRP4 pourrait représenter une potentiel cible thérapeutique de l'HTAP.

## **2.5. Altération de la voie des NCs dans l'IC**

Les altérations de la voie de signalisation des NCs dans l'IC ont bien été décrites au niveau cardiaque où il a été constaté une altération de la voie  $\beta$ -adrénergique et de la production du GMPc ainsi qu'une modification de l'expression des PDEs.

La suractivation du système sympathique rencontrée lors de l'IC est responsable d'une exposition prolongée aux catécholamines circulantes entraînant une désensibilisation des  $\beta$ -AR associée à la diminution de leur densité (Bristow, 1993; Bristow et al., 1986, 2010; Maurice et

al., 1999). Le mécanisme de désensibilisation semble impliquer le découplage du récepteur de sa protéine G, probablement du à la surexpression et l'activité augmentée des kinases GRK et PKA (Koch and Rockman, 1999; Lymperopoulos et al., 2013). L'exacerbation de la voie signalisation du GMPc lors de l'IC semble affecter la réponse  $\beta$ -AR en la diminuant (Hare et al., 1998). En effet, lors de l'IC, l'augmentation de la contrainte mécanique dans les oreillettes et les ventricules, augmente la production d'ANP et de BNP qui stimule leur récepteurs (Chen and Burnett, 1999; Hare et al., 2000). De plus, il a été constaté une activité exacerbée de la iNOS lors de l'IC (Balligand, 1999). L'importante stimulation des NPR et l'activité de la iNOS augmentée participent à l'élévation de la concentration de GMPc.

Des altérations de l'expression, de la distribution et/ou de l'activité des PDE cardiaques ont également été décrites au stade de l'hypertrophie cardiaque et dans l'IC (Ding et al., 2005; Lehnart et al., 2005; Pokreisz et al., 2009). Dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par sténose de l'aorte ascendante, l'activité totale d'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs est diminuée, de même pour la PDE3 et la PDE4 (Abi-Gerges et al., 2009), alors que l'activité des PDE1 et PDE2 est augmentée (Yanaka et al., 2003). Ceci a été associé à une diminution de l'expression des isoformes PDE3A, PDE4A et PDE4B (Abi-Gerges et al., 2009). De plus, l'étude de Lehnart (Lehnart et al., 2005) a révélé que des souris déficientes pour la PDE4D développent une susceptibilité accrue à l'hypertrophie cardiaque, l'IC et les arythmies. Ce phénotype serait causé par une perte de l'interaction entre la PDE4D3 et le récepteur à la ryanodine (RyR) ce qui conduirait à une hyperphosphorylation du RyR par la PKA, et par conséquent à une altération de l'homéostasie calcique.

Au niveau vasculaire, les mécanismes d'altérations de la voie des NCs sont peu étudiés. L'étude de Mc Goldrick (McGoldrick et al., 2007) rapporte une diminution de la réponse relaxante aux agents éleveurs de la concentration d'AMPc et de GMPc dans un modèle l'hypertrophie développée par sténose de l'aorte ascendante chez le cochon d'inde. En effet, la réponse relaxante à des doses croissantes d'isoprénaline, de forskoline et donneur de NO est diminuée dans les artères coronaires alors qu'elle reste inchangée dans les artères mésentériques des animaux malades comparées aux animaux contrôle. Le même type d'altération a été rapporté par deux groupes (Mathew et al., 1993; Nasa et al., 1996) au niveau de l'artère pulmonaire et l'aorte thoracique dans un modèle d'IC obtenue après ligature de l'artère coronaire. Plus récemment, l'étude réalisée dans notre laboratoire (Hubert et al., 2014) dans un modèle d'IC chez le rat, développé par sténose de l'aorte ascendante a révélé d'une part, une altération de la réponse  $\beta$ -adrénergique et aux inhibiteurs de PDE3 et PDE4 et d'autre part, des modifications

de l'expression de certaines isoformes de PDE3 et PDE4 chez les animaux malades. Ainsi, il a été rapporté une perte de la réponse relaxante à des doses croissantes d'isoprénaline ou de l'inhibiteur de la PDE4, le Ro-20-1724, dans le groupe de rat IC alors que la réponse au cilostamide semble inchangée dans les deux groupes. De manière intéressante, l'inhibition de la PDE3 restaure la réponse relaxante du Ro-20-1724 dans le groupe des rat IC. Ceci suggère que la PDE3 masquerait l'activité de la PDE4 chez les rats IC. De plus, il a été constaté une augmentation de l'expression de l'isoforme PDE3A et PDE4B dans les extraits d'aorte de rat IC. Dans cette étude, la réponse  $\beta$ -adrénergique fortement diminuée dans le groupe d'animaux malades ne serait pas associée au phénomène de désensibilisation comme dans l'étude de (Kiuchi et al., 1993) mais plutôt à la régulation négative du GMPc sur la PDE3. En effet, l'amplitude de la réponse des anneaux aortiques issus d'animaux IC est comparable à celle observée chez les SHAM sur lesquels l'endothélium a été altéré mécaniquement (dénudation) ou en cas d'inhibition de la production de NO par le L-NAME. Dans ces 3 cas de figure, la réponse à l'isoprénaline est restaurée par inhibition de la PDE3. Cette étude a permis d'associer l'augmentation de l'activité de la PDE3 aux altérations vasculaires rencontrées au cours de l'IC.

### 3. Les canaux potassiques BK<sub>Ca</sub>

Les canaux potassiques K<sub>Ca</sub> jouent un rôle important dans l'excitabilité cellulaire par leur sensibilité et réactivité à la variation intracellulaire de [Ca<sup>2+</sup>]. Il s'agit de canaux perméables au K<sup>+</sup> caractérisés par une conductance unitaire spécifique permettant leur classification en 3 groupes :

- Les canaux potassique K<sub>Ca</sub> à faible conductance, appelés SK<sub>Ca</sub> pour *small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated channels*. Leur conductance est comprise entre 4 et 14 pS.
- Les canaux potassique K<sub>Ca</sub> à conductance intermédiaire, appelés IK<sub>Ca</sub> pour *intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated channels*. Leur conductance est comprise entre 32 et 39 pS.
- Les canaux potassique K<sub>Ca</sub> à grande conductance, appelés MaxiK ou BK<sub>Ca</sub> pour *large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated channels*. Leur conductance est comprise entre 200 et 300 pS.

Seuls les BK<sub>Ca</sub> peuvent être activés par la dépolarisation membranaire et ou la liaison au Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Les SK<sub>Ca</sub> et les IK<sub>Ca</sub> quant à eux ne sont stimulés que par le Ca<sup>2+</sup> lié à la calmoduline (Wei et al., 2005).

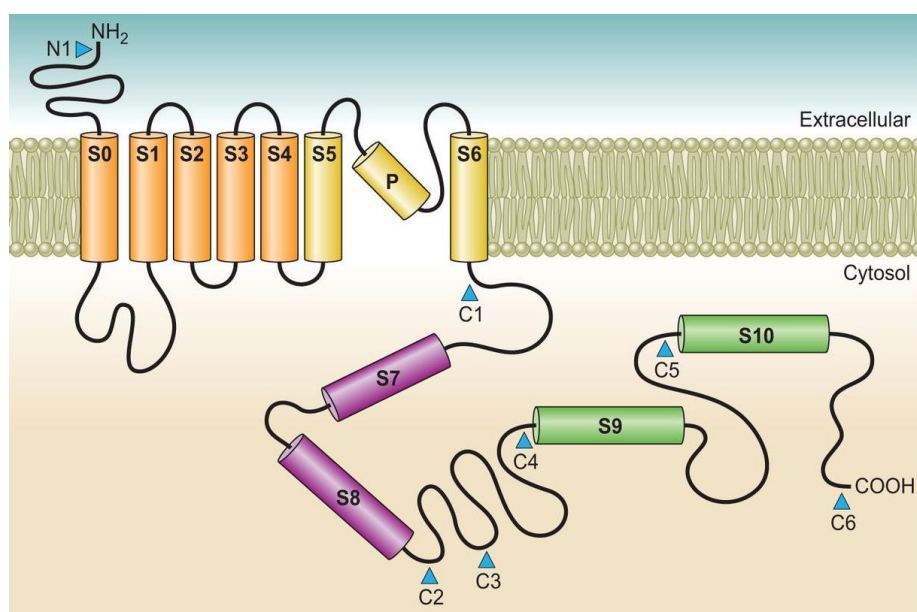
Bien que la distribution des BK<sub>Ca</sub>, SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> soit différente au niveau vasculaire, leur rôle dans la régulation du tonus contractile reste primordial. De manière générale, l'activation des K<sub>Ca</sub> entraîne une repolarisation membranaire suite à l'efflux du K<sup>+</sup>. Comme les BK<sub>Ca</sub> se distribuent préférentiellement dans les CMLs, leur contribution à ce phénomène est directe. A l'opposé, les SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> de localisation endothéliale (Félétou, 2009), y participent de façon indirecte. En effet, leur activation, permet la génération d'un facteur pro-relaxant endothéliale hyperpolarisant appelé EDHF, qui se propage dans la CML via les jonctions myoendothéliales. De la repolarisation des CMLs, résulte la fermeture des canaux calciques voltage dépendant, limitant ainsi l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule et par conséquent induit une vasodilatation.

#### 3.1. Présentation des BK<sub>Ca</sub>

Ce sont des canaux ioniques sélectifs du K<sup>+</sup>. Ils ont pour caractéristique une conductance unitaire importante et leur probabilité d'ouverture est fortement augmentée par de fortes [Ca<sup>2+</sup>], et la dépolarisation (Wu and Marx, 2010). Ces propriétés en font des modulateurs privilégiés de l'homéostasie calcique. En effet, les canaux BK<sub>Ca</sub> sont exprimés dans de nombreux tissus dont le muscle lisse où ils s'opposent à la contraction..et ont un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression artérielle (Brenner et al., 2000; Nelson et al., 1995).

Les BK<sub>Ca</sub> présente une grande homologie de structure avec les canaux K<sub>v</sub>. En effet, les sous-unités  $\alpha$  qui les composent, comportent 6 domaines transmembranaires noté S1 à S6 mais avec un segment supplémentaire, S0 chez les BK<sub>Ca</sub> (Figure 17). Les sous-unités  $\alpha$  s'assemblent en tétramère pour former le pore du canal. D'expression ubiquitaire, elle est codée par un seul et unique gène *KCNMA1*, aussi appelé Slo ou Slo1 et composé de 27 exons avec de nombreux variants d'épissage. Sa traduction génère une protéine de 1196 acides aminés, correspondant à deux fois la taille du pore formant un canal K<sub>v</sub> (Butler et al., 1993). Les segments S1-S6 sont codés par les exons 9-27 alors que le segment S0 est codé par un unique exon, l'exon1 (Latorre et al., 2017). D'un point de vue fonctionnel, les segments transmembranaires S0-S4 sont responsables de la sensibilité du canal à la variation du potentiel de membrane alors que les segments S5-S6 forment le pore du canal BK<sub>Ca</sub> (Wu and Marx, 2010).

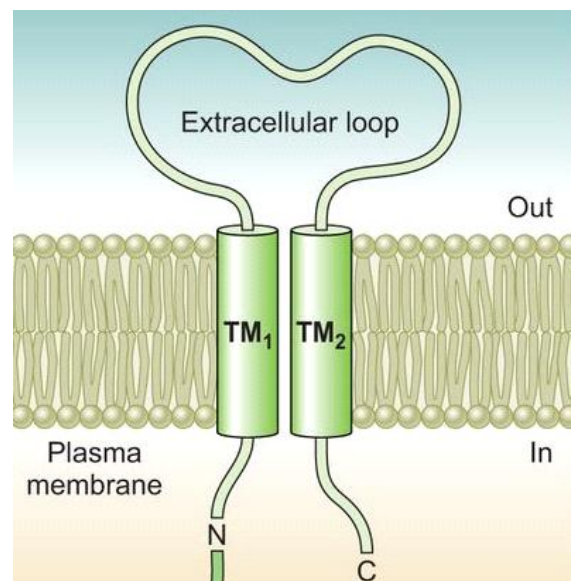
En plus des domaines transmembranaires, la sous-unité  $\alpha$  possède deux domaines cytoplasmiques appelés RCK pour *regulator of K<sup>+</sup> conductance* (RCK1 et RCK2) (Figure 17). Ils constituent les sites de liaison de haute affinité pour le Ca<sup>2+</sup>. Le domaine RCK1 regroupe les segments S7-S8, codés par les exons 14-16. Alors que le domaine RCK2 regroupe les segments S9-S10, codés par les exons 21-24 (Latorre et al., 2017).



**Figure 17 : structure de la sous-unité  $\alpha$  du canal BK<sub>Ca</sub> d'après (Latorre et al., 2017).**

La sous-unité  $\alpha$  est constituée de 7 domaines transmembranaires et de 4 domaines cytosolique : S7-S8 représente le domaine RCK1, S9-S10 représente le domaine RCK2. En flèche bleue, les sites d'épissage alternatif du côté N-terminal (N) et C-terminal (C).

L'épissage alternatif de l'ARNm codant pour la sous-unité  $\alpha$  donne lieu à de nombreux variants dont la présence au sein du complexe peut retentir sur les modes de régulations par les kinases, la réponse aux stéroïdes mais aussi aux NCs. Le plus communément décrit dans la littérature est le variant STREX pour *stress axis-regulated exon* (Xie and McCobb, 1998). Il correspond à l'insertion d'un nouvel exon dans le côté C-terminal du canal  $BK_{Ca}$ . Son activation à des potentiels plus négatifs, le rend plus actif que le variant ZERO dépourvu de l'exon additionnel. Les sous-unités  $\alpha$  sont associées à des sous-unités auxiliaires  $\beta$ , codées par quatre gènes (KCNMB1-4) et dont l'expression varie selon les tissus. La sous-unité  $\beta 1$  est spécifique du muscle lisse alors que les autres sous-unités  $\beta$  se distribuent dans divers tissus. Le cerveau exprime les sous-unités  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 4$  alors que le pancréas n'exprime pas la sous-unité  $\beta 4$ . La sous-unité  $\beta 2$  s'exprime aussi dans les ovaires, la  $\beta 3$  dans la rate et le foie et enfin la sous-unité  $\beta 4$  se distribue aussi dans les glandes surrénales. Elles sont toutes formées de deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 reliés par une grande boucle extracellulaire (Figure 18) (Wu and Marx, 2010).



**Figure 18 : Structure de la sous-unité  $\beta$  du canal  $BK_{Ca}$  d'après (Latorre et al., 2017).**

La sous-unité  $\beta$  se compose de deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 reliés par une boucle extracellulaire.

Des études de *cross-linking* ont permis de mettre en évidence le mode d'assemblage de la sous-unité  $\beta$  et la sous-unité  $\alpha$  : le domaine TM1 s'assemble préférentiellement au segment S1 et S2 tandis que le domaine TM2 s'associe au segment S0 (Liu et al., 2008). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  s'assemblent théoriquement de façon stœchiométrique (1:1) cependant certaines études réalisées sur des systèmes d'expression hétérologue ou tissus natifs ont montrées que la

population des BK<sub>Ca</sub> n'était pas homogène. C'est ainsi que l'étude réalisée par Tanaka (Tanaka et al., 1997) sur des CMLs isolées d'artère coronaire humaine a montré l'existence de deux populations de canaux BK<sub>Ca</sub> : une première, majoritaire, formée par l'assemblage des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et une deuxième, minoritaire, formée exclusivement de sous-unité  $\alpha$ , responsable de l'altération de la sensibilité du canal au  $\text{Ca}^{2+}$  et un activateur agoniste spécifique de la sous-unité  $\beta$  : la dehydrosoyasaponin I. Ces résultats soulignent le rôle de la sous-unité  $\beta$  dans l'amélioration de la sensibilité du canal au  $\text{Ca}^{2+}$ .

D'un point de vue fonctionnel, la sous-unité  $\beta$  contribue à la régulation de la cinétique d'activation du canal et de sa sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, en son absence, cette sensibilité est diminuée (McManus et al., 1995). De plus, elle est responsable de certaines propriétés pharmacologiques du canal. En outre, lorsque le canal BK<sub>Ca</sub> est composé de sous-unité  $\beta_4$ , il devient résistant à l'action inhibitrice de l'ibériotoxine (Meera et al., 2000). Enfin, la présence de la sous-unité  $\beta$  faciliterait le trafic intracellulaire post-traductionnel du canal. Donnée rapportée par l'étude de Kim (Kim et al., 2003) dans laquelle la surexpression de la sous-unité  $\beta$  de façon concomitante à la sous-unité  $\alpha$  améliorait l'adressage du canal à la membrane et par conséquent permettrait une large expression d'un canal fonctionnel.

Plus récemment, il a été rapporté l'existence d'une autre sous-unité auxiliaire dite  $\gamma$ . Le mode d'association à la sous-unité  $\alpha$  et les mécanismes de régulations sont encore peu connus. Elle existe sous 4 isoforme  $\gamma_1$ -  $\gamma_4$  et permettrait l'activation du canal BK<sub>Ca</sub>, en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , entraînant une activation plus précoce du canal qui se traduit par shift vers la gauche de la courbe d'activation du canal. De structure différente de la sous-unité  $\beta$ , elle se compose d'un unique domaine transmembranaire TM associé à un court domaine intracellulaire et à un autre extracellulaire, plus long, formé par la répétition de 6 motif de leucine, appelé LRR pour *leucine-rich repeat*. Les domaines LRR présentent une grande homologie de structure entre les isoformes  $\gamma_1$ -  $\gamma_4$ .

Le canal oscille entre les états « ouvert » et « fermé » et ne s'inactive pas lorsqu'il est associé à la sous-unité  $\beta_1$  (Morales et al., 1996). L'état « ouvert » est favorisé par deux facteurs : l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et la dépolarisation membranaire (Ledoux et al., 2006).

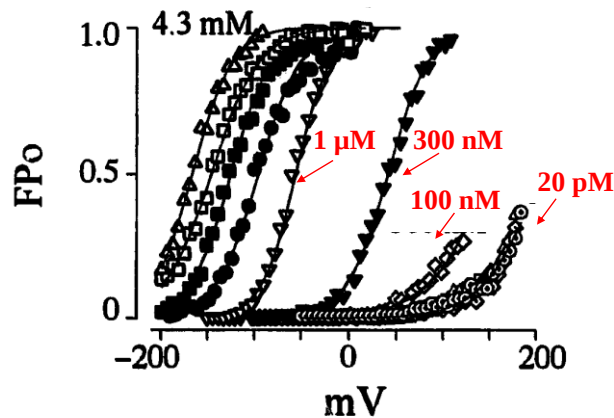
De par leur grande importance au niveau vasculaire, les canaux potassiques BK<sub>Ca</sub> sont sujets à une fine régulation au niveau cellulaire. De plus, la survenue de certaines pathologies cardiovasculaire peut modifier leur expression et/ou leur activité. Ceci sera traité dans le paragraphe 3 de la partie 3.2.

## 3.2. Les canaux BK<sub>Ca</sub> dans les CMLVs et leur rôle physiologique

### 3.2.1. Expression et propriétés des BK<sub>Ca</sub>

Les canaux BK<sub>Ca</sub> sont exprimés dans les CMLs de tous les lits vasculaires. Ils sont formés par l'assemblage de la sous-unité  $\alpha$  avec l'isoforme  $\beta 1$  dont l'expression est spécifique du muscle lisse (Tanaka et al., 2004).

L'étude de Meera (Meera et al., 1996) a permis de mieux comprendre les mécanismes régulant l'activité des BK<sub>Ca</sub>. Pour cela, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta 1$  ont été coexprimées dans des oocytes de *X. leavis*. Une mesure du courant sortant potassique caractéristique du canal BK<sub>Ca</sub> a été réalisée en appliquant des paliers de dépolarisations croissants, par incréments de 5 mV. Cette expérience est renouvelée en présence de  $[Ca^{2+}]$  croissantes. Une courbe d'activation a ensuite été réalisée. Elle exprime la probabilité d'ouverture du canal BK<sub>Ca</sub> en fonction du potentiel de membrane (Figure 19). Il a été conclu, que les faibles  $[Ca^{2+}]$  déplaçaient la courbe d'activation du canal vers la gauche. En outre, plus on augmente le potentiel de membrane lors d'une dépolarisation, plus faible est la  $[Ca^{2+}]$  nécessaire pour activer le canal BK<sub>Ca</sub>.



**Figure 19 : Représentation de la probabilité d'ouverture du canal BK<sub>Ca</sub> (FPO) en fonction de palier de dépolarisation croissant (exprimés en mV) à différentes  $[Ca^{2+}]$  (Meera et al., 1996).**

Les  $[Ca^{2+}]$  sont présentées par ordre croissant, de la gauche vers la droite, elles sont de l'ordre de 4,3 mM ; 647 μM ; 194 μM ; 2,3 μM ; 1 μM ; 300 nM ; 100 nM ; 20 pM.

### 3.2.2. Mode d'activation des BK<sub>Ca</sub> en condition physiologique

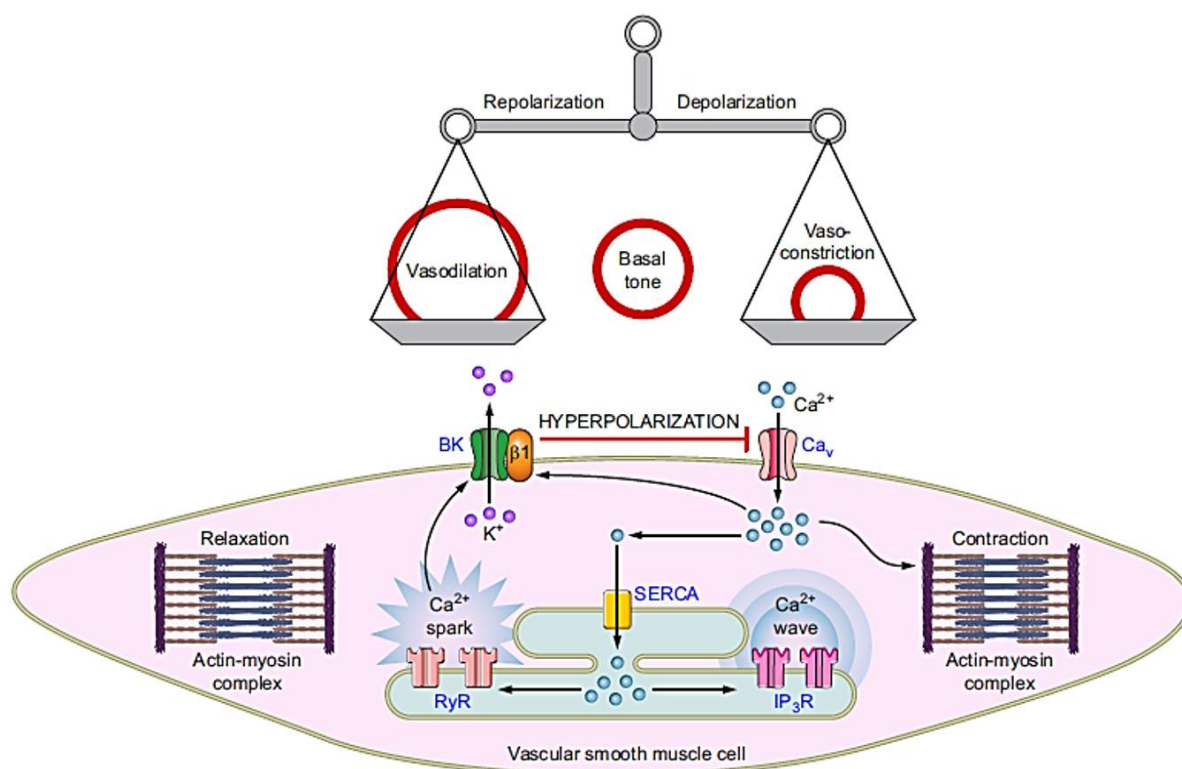
L'étude de Meera (Meera et al., 1996) décrite dans le paragraphe précédent s'est aussi intéressée à la voie d'activation des BK<sub>Ca</sub> en condition physiologique. Il a ainsi été conclu qu'à des valeurs de potentiel membranaire de repos (entre -70 et -40 mV), la  $[Ca^{2+}]_i$  doit atteindre plus de 1 μM



pour que 50% des canaux soient ouverts. Cela supporterait l'hypothèse selon laquelle la proximité de flux calciques avec BK<sub>Ca</sub> favoriserait son activation.

C'est ainsi qu'il a été rapporté à partir de travaux sur les CMLs de coronaires de lapin, que les canaux BK<sub>Ca</sub> peuvent être directement activés par l'influx calcique passant par les LTCC de la membrane plasmique (Guia et al., 1999). De plus, il a été démontré, dans l'aorte de rat et dans les CMLVs humaines en culture, une association macromoléculaire entre ces deux types de canaux grâce au  $\beta$ 2-AR qui servirait de plateforme d'ancrage (Liu et al., 2004a). Cette proximité des canaux calciques favoriserait l'activité des canaux BK<sub>Ca</sub> et leur rôle de « frein » à la dépolarisation et à l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  à l'origine de la contraction des CMLs. Il a aussi été rapporté une interaction physique entre les canaux BK<sub>Ca</sub> et les canaux TRPC1 perméable au  $Ca^{2+}$  dans des CMLs d'aorte de rat en culture (Kwan et al., 2009).

Un mécanisme alternatif d'activation des BK<sub>Ca</sub> a été suggéré par l'équipe de Nelson en 1995 (Nelson et al., 1995) : ces derniers peuvent aussi être activés par l'efflux de  $Ca^{2+}$  sortant des stocks intracellulaires en particulier via les récepteurs à la ryanodine (RyR). L'ouverture spontanée « d'amas » de ces canaux localisés dans la membrane du RS provoque une augmentation transitoire et localisée de la  $[Ca^{2+}]_i$  appelée *sparks* (étincelles) calciques. Les *sparks* calciques ont été décrits pour la première fois dans les myocytes cardiaques (Cheng et al., 1993), puis dans les CMLs d'artère cérébrales isolées (Nelson et al., 1995). De plus, Il a été démontré que, dans les CMLs, les *sparks* calciques provoquaient une élévation locale du  $[Ca^{2+}]_i$  supérieure à 10  $\mu$ M activant ainsi des groupes de canaux BK<sub>Ca</sub> de manière transitoire (ZhuGe et al., 2002). Grâce à la technique de patch-clamp, l'activité des BK<sub>Ca</sub> a pu être enregistrée sous forme de courant ionique transitoire, spontané, sortant, qu'on appelle STOC pour *spontaneous transient outward current* (Bolton and Imaizumi, 1996). Ce couplage entre les RyR et BK<sub>Ca</sub> serait crucial dans le contrôle de la vasomotricité des artères en particulier de petit calibre (Nelson et al., 1995) (Figure 20).



**Figure 20 : Role des canaux BK<sub>Ca</sub> dans les CMLVs** (Latorre et al., 2017).

Dans des conditions en faveur d'une vasoconstriction, la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente suite à l'influx calcique à travers les CCTL ( $Ca_v$ ) et les IP3R du RS permettant la formation d'un complexe actine-myosine pour la contraction. Dans des conditions en faveur d'une vasodilatation, la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente via les RyR, de façon transitoire et localisée qu'on appelle *sparks* calciques. Ces derniers activent les BK<sub>Ca</sub> situés en face de RyR, ce qui hyperpolarise le potentiel de membrane, inhibant les  $Ca_v$ . la diminution des  $[Ca^{2+}]_i$  provoque une relaxation

La présence de la sous unité  $\beta 1$  des canaux BK<sub>Ca</sub> favorise ce couplage entre le RyR et les BK<sub>Ca</sub> du fait qu'elle améliore la sensibilité du canal au  $Ca^{2+}$  (Patterson et al., 2002). L'influx massive de  $Ca^{2+}$  via les CCTL ou encore des RyR contribuent à la création d'un microdomaine calcique (McCarron et al., 2006) qui permet une activation rapide et ciblée des canaux BK<sub>Ca</sub> pour contrer une réponse vasoconstrictrice. De manière intéressante, un polymorphisme génétique de la sous-unité  $\beta 1$  nommé Glu65Lys a été identifié chez l'homme et a été associé à un gain de fonction du canal assurant un effet protecteur vis-à-vis de l'hypertension artérielle (Fernández-Fernández et al., 2004).

Les BK<sub>Ca</sub> ne s'associent pas seulement à des canaux ioniques, mais ils peuvent aussi former des complexes macromoléculaires avec des récepteurs couplés à des protéines  $G_q$ . L'étude de Li (Li et al., 2010), a mis en évidence l'association des canaux BK<sub>Ca</sub> aux récepteurs TP du thromboxane A2 dans des myocytes d'artère coronaire humaine et d'aorte de rat. Cette équipe a décrit un mécanisme de *trans*-inhibition du canal BK<sub>Ca</sub>, indépendant de l'implication de la

protéine G associée au récepteur TP. En effet, l'activation du récepteur TP par un agoniste, l'U46619, permet l'interaction de sa première boucle intracellulaire ainsi que son domaine C-terminal avec l'ensemble du domaine intracellulaire N-terminal du canal BK<sub>Ca</sub> et par conséquent, inhibe son activité. Ces données apportent un exemple de régulation fine de l'activité du canal par l'un de ses partenaires. D'autres niveaux de régulation seront développés dans la section suivante.

### **3.2.3. Régulation physiologique de l'activité des BK<sub>Ca</sub>**

#### **3.2.3.1. Régulation par les kinases**

L'étude réalisée par Yan (Yan et al., 2008) a permis d'identifier une trentaine de site de phosphorylation dans le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\alpha$  du canal BK<sub>Ca</sub>. Dans les CMLVs, l'activité du canal BK<sub>Ca</sub> est modulée par une variété de protéine kinase comme la PKA, la PKG et la PKC.

La phosphorylation par la PKA peut avoir un effet activateur ou inhibiteur selon le variant d'épissage de la sous-unité  $\alpha$  : Elle est activatrice sur le variant ZERO mais inhibitrice sur le variant STREX. En effet, l'activation du variant ZERO nécessite la phosphorylation des 4 sous-unités  $\alpha$  sur la sérine en position 899 alors que la phosphorylation d'un unique site situé au niveau de la sérine 4 de l'exon supplémentaire (Tian et al., 2004).

L'étude réalisée par l'équipe de Porter, du groupe de Nelson (Porter et al., 1998) a permis de mettre en évidence, dans les CMLs isolées d'artère cérébrale et coronaire, le rôle de la PKA dans la modulation de l'activité des BK<sub>Ca</sub> au cours de la voie relaxante de l'AMPc. Il a été rapporté une augmentation de la fréquence des *sparks* couplée à une augmentation des STOCs en présence de forskoline (activateur direct des ACs). L'augmentation de la fréquence des *sparks* serait liée à une augmentation de l'activité de la SERCA et donc du remplissage des réservoirs de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires, suite à la phosphorylation du PLB par la PKA (Wellman et al., 2001). Bien que les effets de l'AMPc soient communément attribués à l'activation de la PKA, il semblerait que, dans l'artère coronaire porcine et l'artère pulmonaire de rat, l'AMPc présent à forte concentration, puissent activer les BK<sub>Ca</sub> *via* la PKG par un mécanisme d'activation croisée ou *cross-activation* (Barman et al., 2003; White et al., 2000).

Enfin, un effecteur de l'AMPc supplémentaire a été récemment décrit comme un modulateur de l'activité des BK<sub>Ca</sub>. Il s'agit du facteur Epac qui par son activation pharmacologique dans l'artère mésentérique augmenterait la probabilité d'ouverture du canal BK<sub>Ca</sub> *via* un mécanisme indirect impliquant les *sparks* calciques (Roberts et al., 2013a).

La voie du GMPc stimule aussi l'activité des BK<sub>Ca</sub> par l'intermédiaire de la PKG. Ce mode de régulation a été décrit suite à la mesure de l'activité du canal BK<sub>Ca</sub> en présence de GMPc ou d'agoniste participant à l'augmentation de ses concentrations intracellulaires tel que les dérivés donneurs de NO (nitroprussiate de sodium). Il a été constaté une augmentation des courants sortants potassiques dans les CMLs d'aorte de rat (Williams et al., 1988). De plus, une étude réalisée sur l'artère coronaire porcine a révélé que l'activation des récepteurs dopaminergiques augmentait la probabilité d'ouverture du canal BK<sub>Ca</sub> via la PKG (Han et al., 1999) cependant le mécanisme d'activation n'a pas été détaillé d'avantage.

Les effets de la PKC sur l'activité des BK<sub>Ca</sub> sont moins clairs. Des effets inhibiteurs et activateurs ont été rapportés selon le type cellulaire. Sur des cellules HEK surexprimant le canal, il a été constaté un effet activateur de l'isoforme  $\delta$  de la PKC sur l'activité des BK<sub>Ca</sub> (Kim and Park, 2008). A l'opposé, il a été rapporté un effet inhibiteur de la PKC dans les CMLs pulmonaire de rat (Shu Zhu et al., 2008).

### **3.2.3.2. Mécanismes alternatifs de régulation**

Un grand nombre de molécules endogènes ont été décrites pour moduler l'activité des BK<sub>Ca</sub>. Elles forment un groupe hétérogène regroupant des hormones, des ions mais aussi des médiateurs d'origine endothéliaux.

#### **3.2.3.2.1. Les hormones stéroïdiennes**

Comme l'aldostérone et les œstrogènes ont été décrit comme étant d'important modulateur du tonus vasculaire et par extension de la fonction cardiovasculaire (Feldman and Gros, 2010). Une partie de leur effet est attribuée à l'implication des canaux BK<sub>Ca</sub> des CMLVs. L'activité de ces derniers est régulée par des mécanismes complexes qui sont soit génomiques ou non-génomiques.

La mesure de l'activité des canaux BK<sub>Ca</sub> a été décrite pour être stimulée par les œstrogènes et les xénoestrogènes dans de nombreux lits vasculaires comme l'artère coronaire (White et al., 1995; Yu et al., 2011), l'artère cérébrale (Zhang et al., 2010) et l'artère utérine (Rosenfeld et al., 2000). Cette activation a été associée à un effet vasodilatateur (Tep-areenan et al., 2003) notamment dans l'artère coronaire (White et al., 1995). Un effet bénéfique du 17- $\beta$  oestradiol dans l'infarctus du myocarde et les arythmies ventriculaires a été décrit par l'étude de Node (Node et al., 1997). Cette hormone stéroïde entraîne une augmentation du flux coronaire par un mécanisme dépendant des canaux BK<sub>Ca</sub> et par conséquent l'amélioration de la zone ischémisée et la réduction de la taille de la zone infarctée.

### **3.2.3.2.2. Les ERO**

Les EROs sont générés au niveau des CMLs ou des CEs régulent le tonus vasculaire par modulation du statut redox intracellulaire (Wolin, 2009). Les canaux BK<sub>Ca</sub> sont activés par le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les CMLs. Leur activation entraîne une hyperpolarisation membranaire et par la suite une vasorelaxation notamment dans l'artère coronaire de porc (Hayabuchi et al., 1998). Cet effet a été associé à un mécanisme indépendant de la voie du GMPc. Une autre étude réalisée par Miura (Miura et al., 2003) a démontré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmentait le flux sanguin dans les coronaires humaines et que cet effet était diminué en présence de charybdotoxine, inhibiteur des BK<sub>Ca</sub> et des IK<sub>Ca</sub> et d'apamine, inhibiteur des SK<sub>Ca</sub>. Ces résultats suggèrent l'implication des canaux K<sub>Ca</sub> dans les effets vasculaire de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.2.3.2.3. Le NO et CO**

Le NO est connu pour être un puissant vasodilatateur. Il peut agir sur diverses cibles intracellulaires dont les BK<sub>Ca</sub>, qui lorsqu'ils sont inhibés, atténuent les effets relaxant du NO (Archer et al., 1994; Wellman et al., 2001). Le NO module l'activité des BK<sub>Ca</sub> selon deux modalités : soit par l'intermédiaire de la PKG qui active le canal par sa phosphorylation (Archer et al., 1994; Peng et al., 1996; Wellman et al., 2001) ; soit par une interaction directe avec le canal BK<sub>Ca</sub> (Bolotina et al., 1994). Un mécanisme a été proposé pour expliquer cette voie d'activation, il s'agirait de la nitrosylation des groupements sulfhydryles de la sous-unité  $\beta$  (Wu et al., 2002). Ceci a pour conséquence l'augmentation de probabilité d'ouverture du canal BK<sub>Ca</sub>.

Le CO est un gaz libéré par les CMLVs et les CEs lors du métabolisme de l'hème par l'hème oxygénase (Zhang et al., 2001a). Comme pour le NO, le CO est responsable d'effets vasodilatateurs qui disparaissent lorsque les canaux BK<sub>Ca</sub> sont inhibés (Naik and Walker, 2003; Zhang et al., 2001b). L'augmentation de la probabilité d'ouverture des BK<sub>Ca</sub> par le CO semble impliquer un mécanisme indépendant de la PKG et des *sparks* calciques (Naik and Walker, 2003). Contrairement au NO qui semble interagir avec la sous-unité  $\beta$  du canal (Wu et al., 2002), le CO quant à lui semble interagir avec les groupement histidines de la sous-unité  $\alpha$  (Wang and Wu, 1997) au niveau du domaine RCK1 (H365, D367 et H394 ) (Hou et al., 2008a) et du domaine RCK2 ( H19) (Telezhkin et al., 2011).

### **3.2.3.2.4. L'acide arachidonique et ses métabolites**

Ce sont des substances vasoactives impliquées dans la régulation du tonus vasculaire. Le 20-HETE a un effet vasoconstricteur alors que l'acide arachidonique et l'acide époxy-eicosatriénoïque (EETs) sont des vasodilatateurs considérés comme des EDHF (Fleming,

2016). En effet, les EETs libérés par l'endothélium vont activer les BK<sub>Ca</sub> présents dans les CMLs pour induire leur relaxation (Fleming, 2016). Ce mécanisme est déjà décrit dans plusieurs lits vasculaire (Busse et al., 2002; Gebremedhin et al., 1992) dont l'artère coronaire bovine (Campbell et al., 1996). Dans cette étude, il a été rapporté un effet relaxant des EETs, abrogé lorsque les BK<sub>Ca</sub> sont inhibé par le tétraéthylammonium (TEA). L'activation des BK<sub>Ca</sub> par les EETs entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture des BK<sub>Ca</sub> associée à une hyperpolarisation, révélée par la mesure du potentiel de membrane.

D'autre part, le 20-HETE, dérivé de l'acide arachidonique exerce un effet inhibiteur sur l'activité des BK<sub>Ca</sub> *via* un mécanisme impliquant la PKC dans les CMLs d'artère cérébrale de chat (Lange et al., 1997). Lors de l'hypoxie, la production du 20-HETE est diminuée, levant ainsi l'inhibition sur les canaux BK<sub>Ca</sub>. Ceci expliquerait en partie la réponse vasodilatatrice observée lors de l'hypoxie cellulaire (Gebremedhin et al., 2008).

#### **3.2.3.2.5. Les protons H<sup>+</sup>**

En général, l'acidification du milieu intracellulaire est associée à un effet vasodilatateur tandis que l'alcalinisation entraîne plutôt une vasoconstriction (Wray and Smith, 2004). L'étude d'Hayabuchi, réalisée sur des CMLs isolées d'artère coronaire porcine en culture révèle que l'acidification du milieu extracellulaire par de l'HCl (pH = 6,8 – 7,3) augmentait l'activité des BK<sub>Ca</sub>, mesurée par patch clamp (Hayabuchi et al., 1998). Un mécanisme expliquant cet effet a été suggéré par Hou (Hou et al., 2008b) à la suite d'expérience de mutagenèse dans lesquelles les H<sup>+</sup> semble interagir directement avec des résidus d'acides aminés spécifiques du domaine RCK1 de la sous-unité  $\alpha$ .

### **3.2.4. Régulation pharmacologique de l'activité des BK<sub>Ca</sub>**

De nombreuses substances d'origine naturelle ou de synthèse modulent l'activité des BK<sub>Ca</sub> en les activant ou en les inhibant. Elles permettent la réalisation d'étude expérimentale afin d'explorer le rôle de ces canaux dans divers systèmes physiologique. Ces substances peuvent être des ions, des toxines isolées de scorpion ou de champignon ou des composés chimiques de synthèse.

#### **3.2.4.1. Les inhibiteurs des canaux BK<sub>Ca</sub>**

##### **3.2.4.1.1. Les cations H<sup>+</sup>, Cs, Ba<sup>2+</sup>**

Ils ont été initialement utilisés par les électrophysiologistes dans les études des propriétés conductrices du canal BK<sub>Ca</sub> et sa sélectivité ionique. Ce sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles du canal BK<sub>Ca</sub>, déplacés par de forte [K<sup>+</sup>] (Latorre et al., 2017).

### 3.2.4.1.2. Le tetraéthylammonium (TEA)

Il fait partie des ammoniums quaternaires et inhibe les BK<sub>Ca</sub> a forte concentration (1 mM). Il se lie soit à des sites situés à la surface externe ( $K_D = 0,2$  mM) ou bien interne du canal BK<sub>Ca</sub> ( $K_D = 30$  mM). La meilleure affinité du TEA pour la surface externe du canal BK<sub>Ca</sub> résulte de la présence de résidu tyrosine au niveau du pore formant le canal. Le TEA n'est pas un inhibiteur sélectif des BK<sub>Ca</sub> car il est aussi décrit comme inhibiteur des certains K<sub>v</sub> (Hadley et al., 2000; Latorre et al., 2017).

### 3.2.4.1.3. Les toxines :

- **La charybdotoxine (ChTx)** est un peptide de 37 acides aminés isolés du venin du scorpion de type *Leiurus quinquestriatus*. C'est le premier peptide inhibiteur des BK<sub>Ca</sub> à avoir été découvert. Il a d'ailleurs joué un rôle important dans la purification et la caractérisation des BK<sub>Ca</sub>. Il est décrit comme un inhibiteur réversible des BK<sub>Ca</sub> ( $IC_{50} = 3$  nM) mais non sélectif car il inhiberait aussi les SK<sub>Ca</sub> et certains K<sub>v</sub>. Le ChTx étant fortement chargé négativement, est attiré électrostatiquement par la face externe du pore formant le canal pour bloquer le flux potassique (Gimenez-Gallego et al., 1988; Goldstein and Miller, 1993).

- **L'ibériotoxine (IBTX)** est un peptide présentant une grande homologie de structure avec la ChTx (environ 68% d'homologie) avec 4 charges positives supplémentaires (acide aminé acide) et une charge négative en moins (acide aminé basique). Il est isolé du scorpion africain *Buthus tamulus*. Il s'agit d'un inhibiteur sélectif du canal BK<sub>Ca</sub> ( $IC_{50} = 250$  pM) (Galvez et al., 1990), le plus fréquemment utilisé pour l'étude des caractéristiques des BK<sub>Ca</sub> dans les différents systèmes physiologiques. Comme pour le ChTx, l'IBTX interagit électrostatiquement avec la face externe du pore canal BK<sub>Ca</sub>, mais sur un site différent de celui de ChTx (Giangiacomo et al., 1992). De plus la durée d'action de l'IBTX semble être 13 fois plus longue que celle du ChTx, mesurée sur ces CMLs isolées d'aorte bovine par la technique de patch-clamp (Giangiacomo et al., 1992).

- **La slotoxine** est un peptide qui présente 75% d'homologie de structure avec l'IBTX. Il est isolé d'un scorpion mexicain de type *Centruroides noxious*. Il inhibe sélectivement et de façon irréversible les BK<sub>Ca</sub> formé de sous-unité  $\alpha$  et  $\beta 1$  cependant il a un faible effet lorsque les canaux sont formés de sous-unité  $\alpha$  et  $\beta 4$  (Garcia-Valdes et al., 2001).

- **La martentoxine (MarTx)** est un peptide qui présente 45% d'homologie de structure avec l'IBTX et ChTx. C'est un bloqueur spécifique des BK<sub>Ca</sub> constitués de sous-unité  $\alpha$  et  $\beta 4$  ( $K_D = 100$  nM) (Tao et al., 2014).

- **La paxilline** est un alcaloïde extrait du champignon *Penicillium paxilli*. Il inhibe les BK<sub>Ca</sub> ( $K_D = 1,9 \text{ nM}$ ) de façon réversible, en se fixant sur la face interne du canal (Latorre et al., 2017).
- Cet effet n'est pas sélectif des BK<sub>Ca</sub> car elle peut aussi inhiber la pompe SERCA ( $IC_{50} = 5 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Bilmen et al., 2002). De plus, il semblerait que l'augmentation des  $[Ca^{2+}]$  diminue l'effet inhibiteur de la paxilline, suggérant une action préférentielle lors de la fermeture du canal (Sanchez and McManus, 1996).
- **Le penitrem A** est un alcaloïde produit par différents champignons du genre *Penicillium*, *Claviceps* et *Aspergillus*. Il s'agit d'un nouvel inhibiteur très intéressant car il est aussi sélectif pour le BK<sub>Ca</sub> que l'IBTX et à moindre coût (Asano et al., 2012). Son  $IC_{50} = 6,4 \text{ nM}$  pour la sous-unité  $\alpha$  et  $64 \text{ nM}$  lorsqu'elle s'associe en plus à la sous-unité  $\beta 1$ . De plus, la mesure de l'activité BK<sub>Ca</sub> par patch-clamp dans les CMLs d'artère coronaire canine révèle qu'il a la même puissance et efficacité que l'IBTX (Asano et al., 2012). Enfin, l'effet inhibiteur du penitrem A résulte de l'interaction soit avec la face interne ou externe du pore du canal (Asano et al., 2012).

#### 3.2.4.2. Les activateurs des canaux BK<sub>Ca</sub>

Il s'agit de molécules développées par les industries pharmaceutiques à but thérapeutique. En effet, ces canaux constituent une cible thérapeutique intéressante de par leur importance dans la régulation du tonus vasculaire et leurs altérations fonctionnelles dans certaines pathologies cardiovasculaires. Les premiers activateurs des BK<sub>Ca</sub> développés étaient des benzimidazolones comme le NS 1619 et NS 004 (Edwards et al., 1994). Ils interagissent avec la sous-unité  $\alpha$  pour potentialiser l'ouverture du canal BK<sub>Ca</sub> (Lawson, 2000). Leur manque de sélectivité a entraîné des effets secondaires qui ont causé l'interruption des essais cliniques.

#### 3.2.5. Importance des BK<sub>Ca</sub> dans la régulation du tonus vasculaire

L'importance des canaux BK<sub>Ca</sub> dans le contrôle du tonus vasculaire est bien établie (Brayden and Nelson, 1992). Tout d'abord, l'inhibition pharmacologique de ces canaux par un inhibiteur sélectif, l'ibériotoxine (Galvez et al., 1990), entraîne une dépolarisation du potentiel de membrane de la CML et par conséquent une vasoconstriction (Nelson and Quayle, 1995a).

De plus, l'étude de souris déficientes pour l'une des sous-unités constituant le canal a permis de souligner leur importance physiologique. En effet, il a été constaté que les souris déficientes



pour la sous-unité  $\alpha$  (*Slo1*<sup>-/-</sup>, Sausbier et al., 2005) ou  $\beta 1$  (Brenner et al., 2000; Plüger et al., 2000) développaient une sensibilité accrue aux agents vasoconstricteurs et le développement d'une hypertension artérielle. De façon plus spécifique, chez les souris déficientes pour la sous-unité  $\alpha$  il a été observé une perte du courant  $K^+$  associé à une dépolarisation suggérant le rôle de cette sous-unité dans le transport du  $K^+$ .

Cependant, d'autres causes qu'une vasoconstriction exacerbée pourrait expliquer le développement de l'hypertension par les souris *Slo1*<sup>-/-</sup>. En effet, comme cette sous-unité s'exprime dans la zone glomérulaire et la glande surrénale, sa délétion perturberait la synthèse de l'aldostérone causant de l'hyperaldostéronisme. Par la suite, Grimm et son équipe (Grimm et al., 2009) ont évalué le rôle de l'hyperaldostéronisme dans le développement de l'hypertension artérielle dans les modèles souris déficientes pour la sous-unité  $\beta$ . L'étude a permis de mettre en évidence une perturbation de l'excrétion rénale du  $K^+$  associée à l'altération fonctionnelle du  $BK_{Ca}$  dans le néphron. Il en résulterait alors une sécrétion excessive d'aldostérone qui aboutit au développement d'une hypertension artérielle. Pour confirmer cette hypothèse, les souris ont été traitées par l'epleronone, antagoniste des récepteurs aux minéralocorticoïdes et une réduction de 70% de la pression artérielle a été observée. Ces résultats indiquent que la délétion de la sous-unité  $\alpha$  ou  $\beta 1$  du canal  $BK_{Ca}$  entraîne une hypertension causée en partie par l'hyperaldostéronisme.

Une altération de l'expression fonctionnelle des canaux  $BK_{Ca}$  est associée à plusieurs modèles de pathologie cardiovasculaire comme l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, le diabète :

- L'hypertension et l'insuffisance cardiaque: il a été rapporté, dans un modèle de rats rendus hypertendus par une perfusion chronique d'angiotensine II (Amberg et al., 2003), ou dans un autre modèle de rats hypertendus de façon spontané (rat SHR) (Amberg and Santana, 2003) une diminution de l'expression de la sous-unité  $\beta 1$  sans modification de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  dans les CMLs d'artère cérébrale. Cette modification d'expression de la sous-unité  $\beta 1$  était associée à l'altération du couplage entre les *sparks* calciques et les canaux  $BK_{Ca}$ . Peu d'études se sont intéressées aux rôles de  $BK_{Ca}$  dans l'insuffisance cardiaque. L'étude de Wan et al., 2013 réalisée dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez la souris, développée à la suite d'une ligature coronaire. Dans cette étude, il a été rapporté une réduction de la fréquence et de l'amplitude des courants sortants potassiques (STOCs) chez les animaux malades en comparaison aux animaux contrôles. Ceci a été associé à une diminution de l'expression des deux sous-unités formant le canal  $BK_{Ca}$  mesurée par immunocytochimie.

- Le diabète : des altérations de l'activité électrique du canal  $BK_{Ca}$  ont été rapportées dans des modèles de souris rendues diabétiques après injection de streptozotocine, toxine qui détruit les cellules  $\beta$  du pancréas. Ceci serait cohérent avec les atteintes multi-vasculaires causées par cette pathologie, notamment dans l'artère coronaire, l'artère cérébrale et l'artère mésentérique dans les deux types de diabète : type 1 (Dong et al., 2008; Lu et al., 2010) et type 2 (Dimitropoulou et al., 2002; Lu et al., 2008). Il semblerait que le diabète affecte spécifiquement l'expression de la sous-unité  $\beta 1$ , comme le décrit une étude du groupe de Navedo (Nystoriak et al., 2014). En effet, il en résulte une altération du couplage fonctionnel au *sparks* calciques avec des risques de développement d'hypertension.

# Objectifs

L'objectif général de ma thèse était de préciser le mécanisme par lequel le tonus des artères de résistances est régulé par certaines PDEs. Cette exploration a été réalisée dans deux lits vasculaires : l'artère coronaire et l'artère mésentérique, en situation physiologique puis dans un modèle d'insuffisance cardiaque (IC) chronique chez le rat.

Dans la première partie, nous avons évalué le rôle des PDE3 et PDE4 dans la régulation de la vasomotricité coronarienne et nous nous sommes intéressés à l'implication d'un type d'effecteur de la voie relaxante de l'AMPc : les canaux potassiques BK<sub>Ca</sub>. Par une approche pharmacologique, en *ex-vivo*, nous avons évalué l'implication de ces canaux dans l'effet relaxant de l'inhibition de la PDE3 et la PDE4, en condition de production constitutive d'AMPc puis en condition stimulée. Nous avons par la suite vérifié la régulation des BK<sub>Ca</sub> par les PDE3 et PDE4 par la technique de patch-clamp. Par une approche biochimique, nous avons réalisé des dosages d'activité enzymatique, mesuré l'expression protéique et évalué l'existence d'une association moléculaire entre ces différentes protéines par la technique de *Proximity Ligation Assay*. Enfin, nous avons étudié les altérations fonctionnelles et biochimiques de cette voie de signalisation en situation pathologique.

Dans la deuxième partie, nous avons évalué le rôle des PDE3, PDE4 et PDE2 dans la régulation du tonus de l'artère mésentérique. Le rôle fonctionnel de ces PDEs a été évalué par une approche pharmacologique sur vaisseaux isolés. Cette partie a été complétée par une approche biochimique (dosage d'activité PDE et Western blot). Cette étude a été réalisée sur des artères isolées de rat contrôle et atteint d'IC.

# Matériels et Méthodes

## **1. Modèle expérimental**

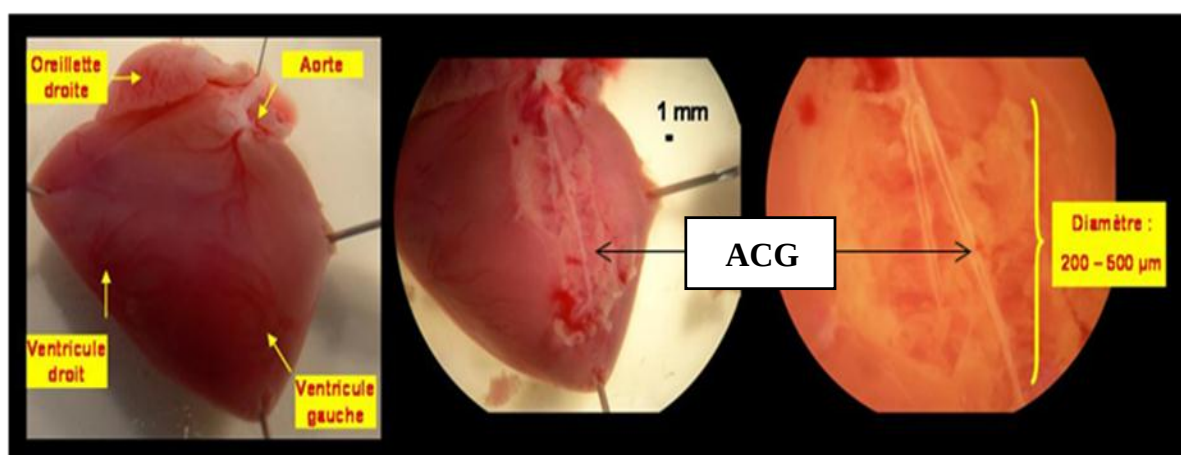
Toutes les expériences ont été réalisées conformément à la directive européenne 2010/63 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et à sa transposition dans le droit français (décret 2013-118 et cinq arrêtés datés du 1er février 2013). Plus spécifiquement, l'autorisation du projet a été délivrée par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur après avis du comité d'éthique local (CEEA n° 26). Les animaux ont été hébergés au sein de la plateforme « AnimEx » de l'IPSIT (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry), plateforme d'hébergement et d'exploration fonctionnelle du petit animal, agréé par le ministère de l'Agriculture. Tous les animaux ont été nourris *ad libitum* et hébergés dans des pièces dans lesquelles l'alternance jour/nuit de 12h/12h et une température constante de 22°C sont imposées.

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé des rats Wistar (souche de rat albinos, créée par croisements consanguins à partir de l'espèce *Rattus norvegicus*). Certains ont été utilisés au stade jeune adulte (poids compris entre 280 et 350 g). D'autres ont subi une chirurgie dans le but d'induire une IC par surcharge de pression. Ce modèle expérimentale est utilisé en routine dans notre laboratoire et a bien été décrit dans la littérature (Feldman et al., 1993; Joubert et al., 2008). Cette opération est réalisée par Valérie Domergue, au niveau de la plateforme « Animalerie et Exploration Fonctionnelle » de l'IFR141/IPSIT (Châtenay-Malabry). Valérie anesthésie les rats âgés de 3 semaines et les place sous ventilation en utilisant un appareillage adapté (small animal ventilator, SAR-830/p, ventilator CWe inc. Ardmore, PA, USA). Une petite incision est réalisée au niveau du thorax afin de permettre la pose d'un clip en titane (Hemoclip plus small reference WK533835, Teleflex Medical) d'un diamètre de 0,6 mm dans la partie ascendante de l'aorte. Le serrage de ce clip conditionne le développement de l'IC. En effet, si ce clip n'est pas assez serré, les animaux ne seront pas malades et à l'opposé, si ce clip est très serré, les animaux ne pourront survivre longtemps après la chirurgie. L'IC est développée à la suite d'une surcharge de pression en amont du clip (au niveau du cœur), il en résulte d'abord, une hypertrophie cardiaque compensatrice qui évolue par la suite en une insuffisance cardiaque congestive avec œdème pulmonaire et ascite. Il s'agit d'un modèle pertinent d'un point de vue clinique car les étapes d'apparition de la pathologie se rapprochent fortement de celle observées chez l'homme. En effet, l'hypertrophie compensatrice évolue par la suite en hypertrophie décompensatrice aboutissant à une IC (Camacho et al., 2016). Les rats sont sacrifiés à la 22<sup>ème</sup> semaine suivant la chirurgie. Cœur, poumon, foie et reins sont isolés

puis pesés et comparé aux organes isolés à partir des rats contrôles (SHAM) appariés par l'âge ayant subi la même manipulation chirurgicale sans pose de clip.

La validation du modèle a été effectuée après normalisation du poids de ces différents organes à la longueur du tibia et constatation d'une augmentation des poids du cœur et du poumon. Ces mesures sont présentées dans la section résultat. D'autre paramètre anatomique ont permis de confirmer l'installation de l'IC congestive comme : l'épanchement pleural et l'ascite.

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons isolé l'artère coronaire interventriculaire gauche (ACG) et/ou l'artère mésentérique. Pour ce faire, les rats sont anesthésiés par une injection de pentobarbital (200 mg/kg, i.p). Ensuite, une thoracotomie est réalisée puis le cœur est rapidement isolé et placé dans une solution physiologique de Krebs à 4°C, aérée avec un mélange d'O<sub>2</sub> (95%) et de CO<sub>2</sub> à (5%), dont la composition est détaillée dans le tableau 3. Les tissus sont ensuite épinglés au fond d'une cuvette contenant la même solution de Krebs, régulièrement renouvelée. Une dissection minutieuse de l'ACG ou des artères mésentériques (200 - 500 µm) est ensuite réalisée sous loupe binoculaire (Figure 21). Les artères coronaires et mésentériques sont ensuite découpées en segments d'environ 2 mm de longueur et montées dans les cuves du myographe pour la réalisation des expériences de réactivité vasculaire. L'ACG et l'artère mésentérique sont dans d'autres cas congelée dans de l'azote liquide pour la réalisation des expériences de biochimie (Western-blot et dosage de l'activité enzymatique des PDEs) et enfin, certaines ACG sont soumises à un protocole de digestion enzymatique afin d'isoler les CMLVs qui la constituent. Ces dernières sont utilisées dans les expériences de patch-clamp et de *Proximity Ligation Assay*.



**Figure 21 : Dissection de la ACG.**

A gauche : mise en place du cœur isolé ; au milieu : mise à nu de l'ACG après dissection partielle du tissu myocardique ; à droite : détail agrandi (x 3).

## 2. Agents pharmacologiques

| Agents pharmacologique                             | Véhicule<br>(%, v/v)      | Concentration<br>utilisée (M)                                            | Propriété<br>pharmacologique                          | Fournisseur       |
|----------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
| Acétylcholine (Ach)                                | Eau 0,1%                  | $10^{-6}$ et $10^{-5}$                                                   | Agoniste des récepteurs muscariniques                 | Sigma Aldrich     |
| 4-aminopyridine (4-AP)                             | Krebs 0,1%                | $10^{-3}$                                                                | Inhibiteur des canaux Kv                              | Sigma Aldrich     |
| Peptide natriurétique atrial (ANP)                 | Acide acétique 0,001% max | $10^{-11}$ à $10^{-6}$                                                   | Agoniste de récepteurs NPRA                           | Sigma Aldrich     |
| BAY 60-7550 (BAY)                                  | DMSO 0,1%                 | $10^{-7}$                                                                | Inhibiteur de la PDE2                                 | Cayman Chemical   |
| Carbachol (Cch)                                    | Eau 0,1%                  | $10^{-5}$                                                                | Agoniste des récepteurs muscariniques                 | Sigma Aldrich     |
| Cilostamide (Cil)                                  | DMSO 0,1%                 | $10^{-6}$                                                                | Inhibiteur de la PDE3                                 | Tocris Bioscience |
| Diéthylamine NONOate (DEA-NO)                      | Eau 0,1% maximum          | $10^{-10}$ à $10^{-5}$                                                   | Activateur de la GCc                                  | Cayman Chemical   |
| Glibenclamide (Glib)                               | DMSO 0,1%                 | $10^{-5}$                                                                | Inhibiteur des canaux $K_{ATP}$                       | Sigma Aldrich     |
| Ibériotoxine (IBTX)                                | Eau 0,1%                  | $10^{-7}$                                                                | Inhibiteur des canaux $BK_{Ca}$                       | Latoxan / Smartox |
| 3-isobutyl-1 méthylxantine (IBMX)                  | DMSO 1%                   | $10^{-1}$                                                                | Inhibiteur non sélectif des PDEs                      | Sigma Aldrich     |
| Isoprénaline (ISO)                                 | Acide ascorbique 0,001%   | $10^{-5}$ à $10^{-11}$                                                   | Agoniste des récepteurs $\beta$ -adrénergique         | Sigma Aldrich     |
| L-858051 (L85)                                     | Eau 0,001% maximum        | $10^{-5}$ à $10^{-10}$                                                   | Activateur de l'ACs                                   | Enzo Life Science |
| 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-méthylxanthine (MIMX) | DMSO 0,1%                 | $10^{-5}$                                                                | Inhibiteur de la PDE1                                 | Calbiochem        |
| Phentolamine                                       | Eau 0,1 %                 | $10^{-5}$                                                                | Antagoniste non sélectif des $\alpha$ - ARs           | Sigma Aldrich     |
| Ro 20-1724 (Ro)                                    | DMSO 0,02 %               | $10^{-5}$                                                                | Inhibiteur de la PDE4                                 | Calbiochem        |
| Ryanodine (Rya)                                    | DMSO 0,3 %                | $3 \cdot 10^{-5}$                                                        | Inhibiteur des récepteurs à la ryanodine              | Alomone           |
| U46619 (U46)                                       | Acétate de méthyle        | $3 \cdot 10^{-7}$ – $10^{-6}$ (CU)<br>$10^{-9}$ – $3 \cdot 10^{-6}$ (CR) | Analogue du thromboxane A2 : agoniste du récepteur TP | Cayman Chemical   |

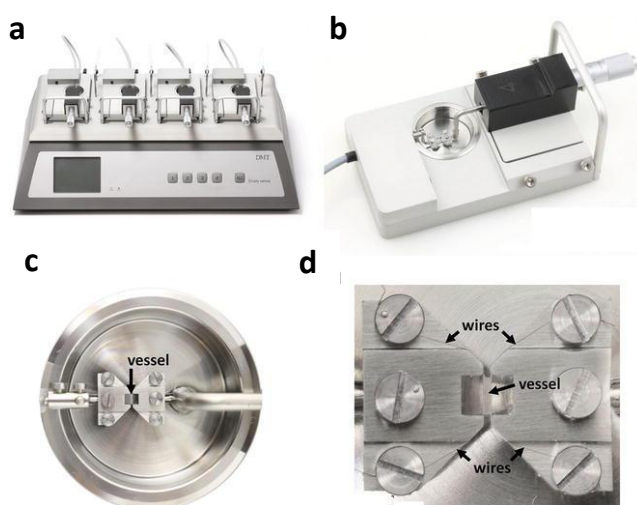
**Tableau 3 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés dans les différentes expériences.** CU : utilisation en concentration unique. CR : utilisation en concentration cumulative.



### 3. La réactivité vasculaire

#### 3.1. Dispositif utilisé

L'étude de la réactivité vasculaire dans les artères coronaires et mésentériques de rat se fait en utilisant un myographe (DMT, 620M Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) adapté pour la mesure de la contractilité des petites artères dont le diamètre est compris entre 100 et 500  $\mu\text{m}$  (Figure 22, a). Cet appareil permet de mesurer la tension isométrique exprimée finalement en mN/mm car rapportée à la longueur du vaisseau (Nyborg et al., 1987). Le myographe est constitué de quatre chambres (Figure 22, b) contenant chacune une cuve (Figure 22, c) pouvant accueillir un segment d'artère d'environ 2 mm de long. Chaque cuve contient 5 mL de solution de Krebs (Tableau 4), thermostatée (37 °C) et aérée avec un mélange de 95 % d'O<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub>. Un système de valves et d'aspiration permet le renouvellement du bain. Dans chaque cuve deux supports ou mâchoires montés en vis-à-vis baignent dans la solution de Krebs. Chaque vaisseau est placé à l'aide de deux fils de tungstène (25  $\mu\text{m}$  de diamètre) traversant la lumière du segment d'artère et vissés sur chacun des supports comme indiqué sur la figure 22 ,d. Chacun des fils est ainsi « solidarisé » avec l'un des supports, dont l'un est fixe et l'autre mobile. Le support fixe est relié à un capteur de force qui mesure la variation de tension générée par le tonus contractile des CMLs et la convertit en un signal électrique qui sera visualisé sur un enregistrement graphique grâce au logiciel LabChart (AD Instruments) après amplification et numérisation par un système d'acquisition de données (AD instrument). Le support mobile est relié à une vis micrométrique graduée qui permet, en la tournant manuellement dans une direction donnée, d'établir l'écartement entre les deux fils et donc le diamètre imposé au vaisseau.



**Figure 22: Composition du myographe DMT 620 M.**

En «a» : représentation générale du dispositif. En «b» : représentation de la chambre du myographe. En «c» : représentation de la cuve contenue dans la chambre et dans laquelle un segment d'artère est monté. En «d» : montage d'un segment d'artère à l'aide de fil de deux tungstènes entre deux mâchoires. D'après Themes, 2016.

### **3.2. La calibration**

La calibration du myographe est une procédure requise avant toute utilisation de l'appareil. Elle a pour but de faire correspondre une force « étalon » avec une valeur donnée du signal électrique reçu par le logiciel d'acquisition. La calibration se fait à l'aide d'un poids (2 g) placé sur un support en T, qui va exercer sur le transducteur une force de 9,81 mN. Une procédure d'étalonnage à l'aide du logiciel Labchart permet alors de faire correspondre un signal (de force) venant du myographe à une valeur précise en mN (Nyborg et al., 1987). Cette procédure a lieu dans les mêmes conditions de chauffage que lors de la réalisation des expériences.

### **3.3. La normalisation**

La normalisation est une procédure qui fait suite au montage des segments d'artères coronaire et mésentérique et précède le protocole expérimental. Elle consiste, à l'aide de la vis micrométrique, en l'étirement des segments d'artère par paliers successifs afin d'établir une relation liant la tension développée par la paroi vasculaire à la circonférence interne du vaisseau (CI). Elle est représentée expérimentalement par une courbe d'extension exprimant la tension exercée à chaque palier d'étirement, en fonction de la CI du vaisseau. CI est calculée selon la formule suivante  $CI = [2Et + (\pi+2)d]$  où «Et» représente la valeur de l'étirement en  $\mu m$  lue sur la vis micrométrique et «d» représente le diamètre du fil de tungstène exprimé en  $\mu m$ . L'intersection de la courbe d'extension avec la droite isobare de Laplace pour 100 mmHg, équivalent à  $13,3 \text{ mN/mm}^2$  (Equation :  $T = 100 \text{ mmHg} \times CI/2\pi$  où T (mN/mm) représente la valeur de tension passive développée par la paroi vasculaire), permet de déterminer la valeur de CI du vaisseau équivalente à une pression transmurale de  $13,3 \text{ mN/mm}^2$ . La valeur de CI utilisée finalement correspond à 90 % de la circonférence qu'un vaisseau au repos aurait à une pression transmurale de 100 mmHg. Il s'agit de la tension passive qui a été décrite comme optimale pour ce type d'artères (Nyborg et al., 1987).

### **3.4. Solution utilisées**

Dans notre protocole expérimental, nous avons utilisé trois solutions salines physiologiques (appelées ci-après « Krebs », «  $0Ca^{2+}$  » et « K80 »). La composition de ces trois solutions est résumée dans le tableau suivant :

| Composant                                         | Concentration (mM) |                   |      |
|---------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------|
|                                                   | Krebs              | 0Ca <sup>2+</sup> | K80  |
| NaCl                                              | 119                |                   | 43,7 |
| KCl                                               | 4,7                |                   | 80   |
| MgSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub> | 1,17               |                   |      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                   | 1,18               |                   |      |
| NaHCO <sub>3</sub>                                | 25                 |                   |      |
| Glucose                                           | 11                 |                   |      |
| CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> | 2,5                | -                 | 2,5  |
| EGTA                                              | -                  | 0,1               | -    |

**Tableau 4 : Composition des solutions de « Krebs », « 0Ca<sup>2+</sup> » et « K80 ».**

La composition de la solution de « Krebs » permet de mimer les conditions physiologiques tout en contrôlant le pH grâce à l'équilibre acido-basique (HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup> / CO<sub>2</sub>). Elle est utilisée tout au long de la dissection et du protocole expérimental et permet de préserver la viabilité de la préparation. La solution de « K80 » est une solution de Krebs enrichie en ions K<sup>+</sup>. En effet une partie du NaCl y est remplacée par du KCl, permettant d'obtenir [K<sup>+</sup>] = 80 mM. La solution de « 0Ca<sup>2+</sup> » est une solution de Krebs dans laquelle le CaCl<sub>2</sub> a été omis, et contient de l'EGTA qui assure la chélation de l'éventuel calcium résiduel. Elle est utilisée lors des lavages afin d'atteindre un état de relâchement total du vaisseau.

### **3.5. Protocole expérimental**

D'abord, nous avons mesuré de la capacité contractile maximale des segments d'artère à l'aide de la solution K80, appliquée pendant 5 min. Les cuves sont ensuite rincées avec la solution 0Ca<sup>2+</sup> (pendant 5 min) puis avec la solution de Krebs (3 x 5 min).

Ensuite, nous avons vérifié l'intégrité de l'endothélium par mesure de la réponse relaxante à l'acétycholine (Ach, 10<sup>-6</sup> M) ou au carbachol (Cch, 10<sup>-5</sup> M) sur des vaisseaux pré-contractés d'abord au K80 puis à l'U46619 (U46, 3.10<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> M). L'Ach est utilisé pour l'artère coronaire et le Cch pour l'artère mésentérique. Seuls les vaisseaux dont la relaxation est supérieure ou

égale à 50 % (mesurée par rapport à la réponse contractile à l'U46619) sont gardés pour le reste de l'expérience. Les cuves sont ensuite rincées comme décrit dans le paragraphe précédent.

Après quoi, nous avons étudié l'effet relaxant induit par l'inhibition de la PDE3 par le cilostamide (Cil,  $10^{-6}$  M) ou l'inhibition de la PDE4 par le Ro-20-1724 (Ro,  $10^{-5}$  M) ou l'inhibition concomitante de ces deux PDEs, sur les segments d'artères coronaires. Pour cela, certains vaisseaux sont pré-incubés au moins 10 minutes avec un inhibiteur de canaux ioniques : ibériotoxine (IBTX,  $10^{-7}$  M) ou ryanodine (Rya,  $3.10^{-5}$  M) ou 4-aminopyridine (4-AP, 1 mM) ou glibenclamide (Glib,  $10^{-5}$ ) ou leur véhicule (Tableau 3). La ryanodine est utilisée à une concentration élevée, décrite pour bloquer le RyR (Roberts et al., 2013b; Sutko et al., 1997). Certains vaisseaux ont, au moment du montage dans la cuve, été débarrassés de leur endothélium de façon mécanique (grattage de l'endothélium avec des moustaches de rat).

Les vaisseaux sont ensuite contractés, sans rinçage préalable, par stimulation avec l'U46, de manière à obtenir une valeur de tension stable, équivalente à celle obtenue avec la solution K80. Dans les cas où l'application de l'U46 ne permet pas d'obtenir une réponse contractile suffisante, la concentration est augmentée de manière cumulative jusqu'à obtenir une contraction satisfaisante. Lorsque la contraction est stable, le Cil est appliqué en premier puis lorsque la relaxation se stabilise, le Ro est appliqué par la suite. Cet ordre d'utilisation peut être inversé sur un autre vaisseau. Les concentrations de Cil et Ro utilisées sont décrites pour être sélectives (Rich et al., 2001; Sudo et al., 2000a).

Enfin, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de la PDE3, PDE4 ou PDE2 sur la réponse relaxante à des d'agents éleveurs de la concentration d'AMPc (ISO, L85) et de GMPc (ANP, DEA-NO). Pour l'artère coronaire, les vaisseaux sont incubés au moins 10 min avec la Rya ou l'IBTX ou leurs véhicules respectifs, associés au Cil ou au Ro ou leurs véhicules respectifs puis avec la phénotolamine pour prévenir toute stimulation potentielle des  $\alpha$ -ARs par l'ISO à fortes concentrations. Ensuite, sans rinçage, les vaisseaux sont contractés avec l'U46 et une fois la contraction à l'U46 stabilisée, les vaisseaux sont stimulés par des concentrations cumulatives d'ISO ou de L85. Pour l'artère mésentérique, les vaisseaux sont incubés avec le Cil, le RO ou avec l'inhibiteur de PDE2, le BAY 60-7550 (BAY,  $10^{-7}$  M) au moins 10 min, ou son véhicule. Ensuite, sans rinçage, les vaisseaux sont contractés avec l'U46 et une fois la contraction à l'U46 stabilisée, les vaisseaux sont stimulés avec des concentrations cumulatives d'ISO, L85, ANP ou DEA-NO.

### **3.6. Collection et traitement des données brutes**

L'amplitude des réponses à l'Ach, Cch, Ro, Cil et Ro+Cil (exprimées en mN/mm) sont calculées par la différence entre le tonus basal (obtenu avec la solution  $0\text{Ca}^{2+}$ ) et le tonus après ajout de l'agent pharmacologique. De la même manière, l'amplitude des réponses à chaque dose d'ISO, L85, ANP et DEA-NO ont été calculées.

Les valeurs relatives ont par la suite été calculées par le rapport entre l'amplitude de la réponse relaxante et l'amplitude de la contraction à l'U46. Elles sont exprimées en %. Pour chaque analyse, les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM. Le nombre de données pour chacun des groupes est désigné par N, correspondant à un animal.

Pour chaque vaisseau, les courbes concentration-réponse sont obtenues en utilisant l'équation de Hill grâce au logiciel Prism7. Puis la concentration produisant 50 % de la réponse maximale ( $\text{CE}_{50}$ ) ainsi que l'effet max ( $E_{\text{max}}$ ) ont été estimés pour chaque courbe. Le  $\text{CE}_{50}$  est par la suite convertie en valeur logarithmique négative ( $\text{pD}_2$ ).

## **4. Patch-clamp**

### **4.1. Principe**

C'est une technique d'électrophysiologie permettant l'enregistrement de l'activité électrique de canaux ionique sur des cellules individualisées. Elle a été mise au point par Neher et Sakmann (Neher and Sakmann, 1976). Elle est notamment basée sur la propriété des pipettes en verre à coller aux membranes biologiques formant ainsi une zone de très forte résistance de l'ordre du giga ohm. En effet, plus cette valeur de résistance est élevée, plus le contact entre la membrane et la pipette est étroit et plus le rapport courant électrique/bruit de fond est élevée. A partir de cette configuration appelée «cellule attachée» (Figure 23) ou l'enregistrement des courants électriques survenant au niveau de la portion membranaire, isolée à l'intérieur de la pipette, tout en assurant un maintien de l'intégrité cellulaire, nous pouvons obtenir trois autres configurations dont la configuration «*inside out*» (Figure 23). Elle est obtenue lorsque la pipette s'éloigne de la membrane détachant sa face interne vers l'extérieur. Le milieu intracellulaire se retrouve alors dans le bain et peut donc être contrôlé.



**Figure 23 : Représentation de la configuration «cellule attachée» (à gauche) et «inside out» (à droite) en patch-clamp (Hamill et al., 1981).**

## 4.2. Solutions utilisées

Dans notre protocole expérimental, nous avons utilisé deux solutions salines physiologiques : la solution A et B. La première constitue le bain contenu dans une boîte de Pétri au fond de laquelle des cellules sont déposées. La seconde est contenue dans la pipette de patch. Leur composition est résumée dans le tableau suivant :

|                   | Concentration mmol/L |            |
|-------------------|----------------------|------------|
|                   | Solution A           | Solution B |
| KCl               | 140                  | 5          |
| NaCl              | -                    | 110        |
| MgCl <sub>2</sub> | 10                   | 1          |
| CaCl <sub>2</sub> | 0,1                  | 2          |
| Hepes             | 10                   | 10         |
| D-glucose         | 30                   | -          |
| PH                | 7,2                  | 7,4        |

**Tableau 5 : Composition des solutions utilisés pour les expériences de patch-clamp.**

## 4.3. Dispositif utilisé

L'observation des cellules lors de l'approche de la pipette d'enregistrement est réalisée sous un microscope inversé à lumière transmise. Le microscope est posé sur une table antivibratoire à l'intérieur d'une cage de Faraday. La pipette remplie d'une solution saline constitue une électrode et est connectée à un filament d'argent recouvert de chlorure d'argent. L'électrode est reliée à un circuit électrique incluant une porte électrode connectée à un amplificateur Axopatch 200B (Axon CNS, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) et un système d'acquisition (Digidata 1440A, Axon CNS). Les signaux sont échantillonnés à 10 kHz et filtrés à 5 kHz. Une électrode de référence baigne dans le bain et est reliée au porte pipette.

Le contrôle du potentiel et l'acquisition du courant traversant la membrane cellulaire est réalisé par le logiciel P-Clamp (Axon CNS) permettant de programmer le protocole de stimulation de la cellule (contrôle du potentiel) ainsi que l'acquisition des données.

Les pipettes utilisées sont réalisées par une étireuse verticale (Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Germany) à partir de tubes capillaires (Vitrex Medical A/S, Denmark) de manière à ce qu'une fois remplies de solution, leur résistance soit comprise entre 2 et 5 M $\Omega$ .

#### **4.4. Protocole**

Dans un premier temps, les artères coronaire fraîchement isolées sont digérées enzymatiquement afin d'isoler les CMLs. Pour cela, l'ACG est infusée dans un milieu de dissociation (MD) composé de (en mmol/L) : 110 NaCl, 5 KCl, 10 Hepes, 0,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 NaHCO<sub>3</sub>, 10 taurine, 0,5 EDTA, 10 Glucose, 0,2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, pH  $\approx$  7, contenant de la papaine à 1,5 mg/ml, en présence de DDT et de BSA (Bovin Serum Albumin, 1 mg/mL) pendant 13 min à 37°C. Une fois le tissu digéré, il est lavé 3 fois dans du MD froid puis trituré à l'aide d'une pipette Pasteur dont l'extrémité est polie. Ceci permet la dissociation des CMLs de la matrice tissulaire, qui se retrouvent libres dans la solution. Après élimination du tissu digéré, une centrifugation à 200g, 4°C pendant 5 min permet de concentrer les CMLVs au fond du tube. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 0,5 mL de MD dans un microtube conservé sur lit de glace. Les cellules sont ensuite utilisées jusqu'à 7 h après dissociation.

Ensuite, nous avons mesuré le courant unitaire du canal BK<sub>Ca</sub> en utilisant deux configurations : soit en cellule attachée, soit en «*inside out*» (patch excisé). La suspension cellulaire est déposée dans une boîte de Petrie puis recouverte délicatement avec la solution A dont la composition est indiquée dans le tableau 5. Un système de perfusion permet de perfuser les CMLs avec une solution véhicule contenant du DMSO à 0,03% pendant 2 à 5 min. Après quoi, différentes combinaisons d'inhibiteurs de PDE sont perfusées : soit le Cil, soit le Ro, soit les deux inhibiteurs simultanément. Pour certaines expériences, de l'IBTX a été ajoutés dans la solution B, contenue dans la pipette.

#### **4.5. Traitement des données**

L'analyse des données sur le module Clampfit du logiciel PClamp (Axon CNS, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) permet de déterminer la probabilité moyenne d'ouverture NP<sub>0</sub> (NP<sub>0</sub> = nombre de canaux x probabilité d'ouverture) ainsi que la moyenne des amplitudes de courant unitaire obtenues sur une durée de 0,5-5 min d'enregistrement. Pour chaque analyse,

les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM. Le nombre de données pour chacun des groupes est désigné par n, correspondant à une cellule.

## **5. Méthodes biochimiques**

### **5.1. Extraction des protéines**

Le protocole d'extraction de protéines a été adapté en fonction de l'expérience à réaliser (Western blot ou dosage de l'activité hydrolytique des PDEs pour l'AMPc). En effet, pour l'étude de l'expression protéique, les ACGs et les artères mésentériques sont incubées dans 100  $\mu$ L d'un tampon de lyse froid, constitué de 50 mM Tris- HCl (pH = 8), 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 0,5% (v/v) sodium deoxycholate, 0,1% (v/v) SDS et un mélange d'inhibiteur de protéase (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail™, Sigma-Aldrich). Alors que pour le dosage de l'activité PDE, les protéines sont extraites à l'aide d'un tampon constitué de 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% (v/v) NP-40 and 1  $\mu$ M de microcystin. Les tissus sont par la suite homogénéisés dans des tubes contenant des billes en céramique à l'aide d'un broyeur de tissu «Procellys 24 ®» (Bertin instrument, Montigny-Le-Bretonneux, France). Le lysat est ensuite récolté dans des tube « eppendorff » et déposé sur de la glace pendant 10 à 30 min). Les extraits tissulaires sont collectés après centrifugation à 12000 g, à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est prélevé puis les protéines y sont dosées par la méthode BCA décrite ci-après.

### **5.2. Dosage des protéines**

Les protéines extraites sont dosées par une technique colorimétrique utilisant l'acide bicinchonique contenu dans le kit *Smart™ Micro BCA Protein Assay* (iNtRON biotechnologie, France). Les protéines réduisent le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . Ce dernier a une forte affinité pour l'acide bicinchonique et forme en sa présence un complexe de couleur pourpre ayant une absorption optique maximale à 532 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration de protéine contenue dans l'échantillon.

La concentration est déterminée graphiquement à l'aide d'un courbe étalon réalisé à partir d'une gamme de concentration connue de BSA. Certains échantillons sont dilués si nécessaire afin de se situer dans la partie linéaire de la gamme. La préparation de cette gamme de dilution a été effectuée avec les mêmes proportions de tampon de lyse ayant servi à la préparation des échantillons. Il en résulte donc, une droite établissant une relation linéaire entre la concentration et l'absorbance mesurée. Cette dernière permettra le calcul de la concentration inconnue de



protéine contenue dans les échantillons à partir des absorbances lues après la réaction BCA écrite ci-dessus.

En moyenne, on obtient 100 µg de protéines à partir d'une artère coronaire et 250 µg à partir de 8 branches d'artères mésentériques.

## **6. Dosage de l'activité PDE-AMPc**

### **6.1. Principe**

L'activité des PDEs est mesurée par un dosage radioenzymatique adapté du protocole décrit par Thompson et Appleman (Appleman and Thompson, 1971). Le principe de cette technique repose sur l'hydrolyse *in vitro* du 3',5' AMPc en 5'-AMP par les PDE présentes dans les lysats. Ensuite Une 5'-nucléotidase contenu dans le venin de serpent transformera le 5'-AMP en adénosine qui sera, par la suite, séparé du substrat non hydrolysé (AMPc) par passage sur une résine échangeuse d'ion. L'incorporation d'AMPc tritié dans la réaction permet de quantifier la proportion d'AMPc hydrolysé par les PDEs en condition d'excès de substrat. Cette dernière est directement proportionnelle à la radioactivité mesurée dans les fioles à l'aide d'un compteur à scintillation.

### **6.2. Protocole**

Le dosage de l'activité PDE a été réalisé sur 10 µg de protéines extraites à partir d'artère coronaire ou mésentérique (décrit dans la partie 5.1 des méthodes). La réaction a lieu dans un volume de 200 µL en présence 10 mM Tris-HCl (pH = 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol et 1 µM d'AMPc froid et complétées avec 105 cpm [<sup>3</sup>H]-AMPc (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Les tubes sont incubés dans un bain Marie chauffé à 33°C pendant 30 min. Ceci permet donc l'hydrolyse de l'AMPc en 5'-AMP par les PDEs présentes dans nos échantillons. L'arrêt de la réaction par dénaturation des enzymes à l'aide d'eau bouillante pendant 1 min. Le 5'-AMP, produit de la réaction, est ensuite hydrolysé en adénosine par l'incubation du mélange réactionnel avec 50 µg de venin de serpent (*Crotalus atrox*, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 20 min à 33°C. L'utilisation d'une résine échangeuse d'anions AG1-X8 (BioRad, Hercules, CA, USA) permet de séparer l'adénosine du 5'-AMP non hydrolysé qui est retenu par la résine. L'adénosine sera ensuite élué dans des fioles et le dosage de l'activité est réalisé en présence d'un liquide à scintillation grâce à un compteur à scintillation β. Deux séries de tubes ne contenant pas de protéines sont préparées : une pour calculer la « radioactivité totale » (quantité d'AMPc tritié ajouté dans les tubes ; le contenu de ces tubes n'a pas été déposé sur les colonnes de résine échangeuse d'anions) et une seconde

pour déterminer le « blanc » (quantité d'AMPc tritié mesurée dans l'éluat de tubes ne contenant pas d'extrait protéique, donc *a fortiori* par de PDE, ni d'hydrolyse de l'AMPc : le niveau d'hydrolyse est donc théoriquement nul).

La quantité de protéines choisies pour ce dosage, ainsi que la durée l'étape de réaction a été déterminée de façon à ce que le pourcentage d'hydrolyse du nucléotide en absence d'inhibiteur reste inférieur à 15%. Il est calculé selon la formule:

$$\% \text{ d'hydrolyse} = (X - \text{blanc}) / (\text{radioactivité totale} - \text{blanc}) \times 100$$

Où X représente la radioactivité de l'éluat dans le mélange réactionnel sans inhibiteur de PDE. Ce pourcentage d'hydrolyse permet d'assurer que la réaction s'effectue dans des conditions optimales garantissant la linéarité de la réaction.

La contribution des différentes familles de PDEs a été évaluée par l'utilisation d'inhibiteur sélectif pour chaque famille. L'activité résiduelle obtenue est ensuite rapportée à l'activité totale en absence d'inhibiteur. La contribution de la famille de PDE inhibée pourra être déduite de la soustraction de l'activité résiduelle à l'activité totale.

### **6.3. Analyse des résultats**

Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicat au cours de la même expérience afin de limiter la variabilité. L'activité enzymatique est calculée selon la formule suivante :

Activité enzymatique (*pmol/min/mg*) =  $[(\% \text{ d'hydrolyse} \times \text{quantité d'AMPc}) / (\text{temps d'incubation} \times \text{quantité de protéine})]$ .

Les résultats sont exprimés en % d'activité d'hydrolyse résiduelle observée en présence d'inhibiteur de PDEs. L'activité PDE-AMPc totale correspondant à l'activité PDE en absence d'inhibiteur. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM. Le nombre de données pour chacun des groupes est désigné par n, correspondant au nombre d'expérience réalisées de 2 ou 3 rats.

## **7. Western blot**

### **7.1. Principe**

Il s'agit d'une technique permettant de détecter et quantifier une protéine d'intérêt à partir d'un lysat, après une électrophorèse et à l'aide d'anticorps spécifique de cette protéine. Elle se déroule en plusieurs étapes : après préparation des échantillons dans le tampon de dénaturation approprié, ces derniers sont déposés dans un gel d'électrophorèse qui permettra de les séparer selon leur poids moléculaire grâce à un courant électrique. La migration des protéines

terminées, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les protéines y adhèrent par des liaisons ioniques et hydrophobes qui s'établissent avec la membrane. Ensuite, vient l'étape de blocage de la membrane afin de limiter les interactions non spécifiques entre cette dernière et les anticorps. Enfin, après incubation avec des anticorps primaires, l'utilisation d'anticorps secondaire marqués permettra la détection des protéines d'intérêt.

## **7.2. Protocole**

Après extraction des protéines comme décrit dans la partie 5.1 des méthodes, une quantité de 50 µg (voire 150 µg ou 200 µg pour les expériences sur l'artère mésentérique) est mélangée à un tampon de charge « Laemmli » contenant de la composition suivante : glycérol 5% (v/v), bleu de bromophénol 0,001% (m/v), 62,5 mM Tris-HCl (pH = 6,8) et du β-mercaptoéthanol à 2,5% (m/v), ajouté extemporanément. Les échantillons sont ensuite soit chauffés à 95°C pendant 5 min (pour la détection des PDEs), soit incubés dans de la glace pendant 10 min sans chauffage (pour la détection de la sous-unité α du canal BK<sub>Ca</sub> (α- BK<sub>Ca</sub>)).

Après quoi, ils sont chargés dans un gel de concentration constitué d'acrylamide 5% (m/v), 127 mM Tris (pH 6,8), 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED et 0,1% (v/v) de persulfate d'ammonium. Ce gel d'une épaisseur de 2 mm est coulé sur un gel dit de séparation car il permet la séparation des protéines lors de la migration sous l'action d'un champ électrique. Le gel de séparation est constitué d'acrylamide 8% (m/v), 375 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % (m/v) SDS, 0,04 % (v/v) TEMED et 0,1% (v/v) de persulfate d'ammonium.

Une fois le gel chargé, avec le marqueur de taille et les échantillons, il est placé dans une cuve de migration et baigne dans un tampon salin composé de 25 mM Tris Base, 190 mM glycine et 0,1% SDS. Un premier champ électrique de 80 V est appliqué pendant 30 min. il permet la concentration des échantillons dans le premier gel puis la tension de ce champ est augmentée jusqu'à 120 V pour permettre la séparation des protéines dans le deuxième gel (durée moyenne 1 h).

Après quoi, les protéines sont transférées sur une membrane en PVDF préalablement activée en l'imbibant dans du méthanol pendant 5 min. Cette dernière est ensuite rincée à l'eau désionisée et mise au contact du gel (contenant les protéines). L'ensemble est pris en sandwich par une pièce rectangulaire adaptée de papier Wattman et une éponge. Le transfert a lieu dans une cuve remplie de tampon (constitué de 25 mM Tris base, 190 mM glycine, 20% (v/v) de

méthanol), sous un champ électrique de 120 V, pendant 1h30 à +4°C. Les protéines chargées négativement, vont migrer vers la membrane chargées positivement.

Ensuite, la membrane est incubée pendant au moins 1 h, à température ambiante et sous légère agitation dans une solution de lait à 5% (m/v) dissout dans un tampon « TBSTween » constitué de 0,153 M Trizma-HCl, 1,36 M NaCl, 0,1% (v/v) de Tween. Il s'agit d'une étape importante car elle permet la saturation des sites non spécifiques.

Enfin la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt durant une nuit, à +4 °C, sous légère agitation. L'anticorps est préparé dans une solution de lait à 5% (m/v) dans du TBSTween. La dilution dépend de l'anticorps utilisé : l'anticorps anti  $\alpha$ -BK<sub>Ca</sub> (1/500, anticorps monoclonal commercialisé par NeuroMab, UC Davis, USA), l'anticorps anti-PDE4B (1/1000, anticorps gracieusement fourni par le Fr Marco Conti, Université de Californie San Fransisco, CA, USA), l'anticorps anti-PDE3A (1/10 000, anticorps gracieusement fourni par le Dr Chen Yan, Université de Rochester, Centre Médical, NY, USA), l'anticorps dirigé contre la PDE3B (1/1000, anticorps gracieusement fourni par le Pr Emilio Hirsch, Université de Turin, Italie), l'anticorps anti-PDE2 ( au (1/300, anticorps commercialisé par Santa Cruz Biotechnology, sc-17228, Dallas, TX, USA) et l'anticorps anti-GAPDH (1/4000; #2118, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA). Après 3 lavages de 10 minutes au TTBS, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié (dirigé contre l'espèce de l'anticorps primaire utilisé), couplé à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP).

La révélation se fait par chimie-luminescence après incubation des membranes avec le réactif, substrat de la peroxydase (Kit Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Nous avons utilisé différents réactifs de sensibilité différente selon le type de protéine à révéler. Le signal émis est analysé à l'aide d'une caméra CCD ChemiDoc™ (BioRad).

### **7.3. Analyse des données**

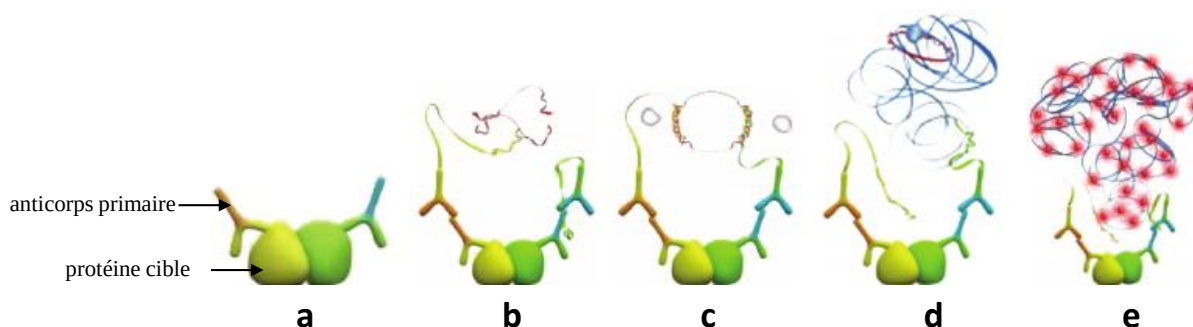
L'intensité des différentes bandes est quantifiée par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ. Le rapport des valeurs de la protéine d'intérêt sur la GAPDH est calculé pour chaque échantillon (SHAM et IC), et un pourcentage de variation de l'intensité par rapport au contrôle (moyenne des valeurs des groupes de rats SHAM) permet de déterminer le niveau relatif d'expression de la protéine d'intérêt dans les deux groupes d'animaux. Les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM. Le nombre de données pour chacun des groupes est désigné par n, correspondant au nombre d'expériences indépendantes.

## 8. Proximity Ligation Assay

### 8.1. Principe

C'est une technique de marquage immunocytochimique permettant de visualiser *in situ* des complexes formés de deux protéines localisée à une distance inférieure à 40 nm.

Deux anticorps primaires produits à partir d'espèces différentes sont chacun dirigés contre une protéine spécifique du complexe à étudier (Figure 24, a). Ces derniers sont incubés en présence d'anticorps secondaires conjugués à des oligonucléotides (Figure 24, b). Chaque anticorps secondaire est dirigé contre l'isotype d'un des deux anticorps primaire utilisé. Lorsque la distance entre les deux protéines d'intérêt est  $\leq 40$  nm, une ligase associe les nucléotides complémentaires entre eux (Figure 24, c), puis une polymérase utilise des nucléotides pour assurer l'élongation et l'amplification de la boucle d'ADN de façon circulaire (Figure 24, d). Par la suite, l'association à des oligonucleotides fluorescents (Figure 24, e) permet l'observation des interactions protéiques au microscope fluorescent.



**Figure 24 : Etape de la technique de PLA** (M A BobriCh and Shwab, 2013).

### 8.2. Protocole

Dans un premier temps, les artères coronaires fraîchement isolées sont digérées enzymatiquement afin d'isoler les CMLVs. Ces dernières sont ensuite fixées puis perméabilisées et enfin incubées avec les anticorps primaires. A la suite de ceci le protocole proprement dit de PLA peut commencer.

#### 8.2.1. **Isolement des CMLVs**

Elle est réalisée de la même manière que pour la technique de patch-clamp, partie 4.4 des matériels et méthodes. La différence réside dans le processus de digestion utilisé. En effet, l'ACG est infusé dans la papaine à 1,5 mg/ml pendant 1 h, après quoi du DDT est ajouté (1 mg/mL). Le tissu est alors incubé à 37°C pendant 6 min sous légère agitation. Il est ensuite

transféré dans une solution de dissociation (MD, décrite plus haut, Cf section IV.D. contenant un mélange de la collagénase H (Roche, 1074032 ou Sigma Aldrich, C7926) (1,6 mg/mL) et d'inhibiteur de la trypsine (Sigma Aldrich, T6522) (1,6 mg/mL) puis incubée à 37°C pendant 4 min. La suite du processus d'effectue comme décrit précédemment – rinçage, centrifugation légère et resuspension dans du milieu MD.

### **8.2.2. Fixation des CMLVs**

Une goutte de suspension cellulaire (50  $\mu$ L si CMLVs de rat jeune et 100  $\mu$ L si CMLVs de rat SHAM/IC) est déposé sur une lamelle de 12 mm de diamètre et laisser adhérer au moins 20 min puis fixer avec du PFA 4% (préparée dans du PBS) pendant 10 min à température ambiante.

### **8.2.3. Perméabilisation et quenching**

Après 3 lavages de 5 min au PBS, les CMLVs sont perméabilisées avec une solution contenant 0,1% Triton X-100 et 0,2% BSA pendant 10 min à température ambiante puis directement incubées dans une solution de quenching à 50 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (préparée dans du PBS) pendant 30 min à température ambiante. Cette dernière étape permet de limiter l'autofluorescence. A la suite, les lamelles sont lavées pendant 5 min avec une solution de PBS et le protocole de PLA (Duolink® PLA, Sigma-Aldrich) proprement dit est effectué suivant les recommandations du fournisseur.

### **8.2.4. Protocole de PLA**

Toutes les incubations ont lieu en chambre humide. Les tampons A et B utilisés pour les lavages sont préparés par nos soins selon les indications du fournisseur dans de l'eau ultra pure. Le tampon A contient (en mol/L : 0,01 Tris, 0,15 NaCl, 0,05% Tween-20 et le pH est ajusté à 7,4) le tampon B contient (en mmol/L) : 0,2 Tris, 0,1 NaCl le pH est ajusté à 7,5. Les solutions de blocage, de ligation et polymérisation sont vendues avec le coffret (Duolink® PLA, Sigma-Aldrich). Toutes les expériences de PLA ont été réalisées le même jour afin de limiter la variabilité du signal obtenu finalement.

- Incubation des lamelles avec la solution de blocage 1h à 37°C.
- Incubation avec les couples d'anticorps primaires toute la nuit à +4°C : chaque couple contient l'anticorps dirigé contre la  $\alpha\text{-BK}_{\text{Ca}}$  (1/300, espèce animale : souris). Ce dernier est associé soit à un anticorps anti-PDE4 « pan-spécifique » (1/100; #PD4-101AP, FabGennix, Frisco, TX, USA, espèce animale : lapin), soit aux anticorps anti-PDE3A (1/300, espèces animale : lapin), ou anti-PDE4B (1/100, espèce animale : lapin) décrits plus haut.

- Après deux lavages de 5 min chacun avec le tampon A, les lamelles sont incubées pendant 1h à 37°C avec un mélange d'anticorps secondaires conjugués anti-souris et anti-lapin dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans un tampon spécial présent dans le coffret.
- Après deux lavages de 5 min chacun avec le tampon A, les lamelles sont incubées avec la solution de ligation pendant 30 min à 37°C. Elle est préparée par dilution de la solution stock au 1/5<sup>ème</sup> dans de l'eau ultrapure. La ligase diluée au 1/40<sup>ème</sup>, très fragile, est ajoutée extemporanément, juste avant le dépôt sur les lamelles.
- Après deux lavages au tampon A, c'est l'étape d'amplification. Il s'agit d'une étape cruciale où il y a ajout des nucléotides, oligonucléotides fluorescents et des cofacteurs de la polymérase. Elle doit être réalisée à l'abri de la lumière. La solution de polymérisation se prépare de la même façon que la solution de ligation et la polymérase diluée au 1/80<sup>ème</sup> doit être ajoutée extemporanément, juste avant dépôt sur les lamelles. Elles sont incubées à 37°C pendant 100 min. Des expériences préliminaires réalisées sur des CMLs de rat SHAM et IC nous ont révélés une saturation du signal fluorescent pour le couple BK<sub>Ca</sub>-PDE4B. Afin de pouvoir quantifier ce signal, nous avons décidé de réduire le temps d'amplification à 90 min.
- Enfin, les lamelles sont lavées deux fois avec le tampon B pendant 10 min puis 1min avec le tampon B dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure.
- Montage des lamelles avec une préparation de mowiol (Mowiol® 4,88 g, glycerol 6 g, TrisHCl 0,2 mol/L, l'ensemble des produits sont commercialisés par Sigma Aldrich). Les lames sont laissée à sécher dans une boîte à l'abri de la lumière et à +4°C.

### **8.2.5. Observation des lames**

Elle se fait dans un microscope à fluorescence (SP5, Leica Microsystemes SAS) à l'aide d'un objectif à eau, à grossissement x60. Le signal PLA est détecté par excitation avec un laser à 554 nm et une émission à 579 nm. Des paramètres d'acquisition identiques ont été utilisés pour l'observation de la fluorescence émise par chaque couple d'anticorps.

### **8.3. Analyse des images**

Les images Tiff ont été récupérées pour être analysées à l'aide d'ImageJ. Chaque image a été transformé en 8 bits puis binarisée en utilisant une valeur seuil, fixée arbitrairement et spécifique de chaque couple d'anticorps. Cette valeur a été déterminée de manière à pouvoir visualiser les points fluorescents de façon claire et distincte du signal de fond. Les résultats sont exprimés en % de la surface cellulaire couverte par le signal fluorescent. Pour chaque analyse, les résultats sont exprimés selon la moyenne  $\pm$  SEM. Le nombre de données pour chacun des groupes est désigné par n, correspondant à une cellule.

## **9. Analyse statistique des données**

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 7 (Graphpad, La Jolla, CA, USA). Les comparaisons « deux à deux » sont effectuées en utilisant le test non paramétrique de Mann et Whitney. Dans le cas de comparaisons appariées, utilisées pour la mesure de l'effet d'un inhibiteur de PDE sur l'activité du canal BK<sub>Ca</sub> vs le contrôle, dans la même cellule, nous avons utilisé le test non paramétrique de Wilcoxon. Pour les comparaisons impliquant plus de deux traitements, nous avons utilisés une ANOVA à une voie complétée par le test Homl-Sidak. Enfin, pour les comparaisons impliquant plus de deux variables (courbes concentration-réponse et comparaison des traitements entre les groupes SHAM et IC), nous avons réalisé une ANOVA à deux voies. Dans le cas de l'analyse des courbes concentration-réponse, le test a été adapté aux mesures répétées. Le test est considéré comme statistiquement significatif lorsque  $P < 0,05$ .



# Résultats

# **Projet I : Rôle des PDE3 et PDE4 dans la régulation de la vasomotricité de l'artère coronaire : implication des BK<sub>Ca</sub> et évolution lors de l'insuffisance cardiaque**

## **1. Introduction**

L'artère coronaire assure une perfusion continue et adaptée du muscle cardiaque. Sa fonction est évaluée par la mesure de la réserve coronaire (rapport entre le débit maximal et le débit au repos). Sa diminution peut être observée lors du remodelage hypertrophique du cœur, un processus physiopathologique pouvant évoluer vers l'IC (Vatner and Hittinger, 1993). C'est ainsi que chez des patients présentant une hypertrophie ventriculaire, associée soit à une hypertension (Hamasaki et al., 2000; Opherke et al., 1984) soit à une cardiomyopathie (Misawa et al., 2002), il a été constaté une diminution de la réserve coronaire. Celle-ci pourrait contribuer à l'aggravation de la pathologie et l'augmentation des risques ischémiques (Cecchi et al., 2003; Vatner and Hittinger, 1993).

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la diminution de la réserve coronaire dans le remodelage pathologique du cœur chez l'homme, notamment une altération structurale de la paroi des vaisseaux, accompagnée d'une dysfonction de la vasomotricité (Hamasaki et al., 2000; Opherke et al., 1984). L'utilisation de modèles animaux d'hypertrophie et d'IC permet de caractériser de manière plus approfondie ces transformations. Par exemple, l'étude de McGoldrick (McGoldrick et al., 2007) a rapporté des altérations des réponses relaxantes dépendantes et indépendantes de l'endothélium mais le mécanisme moléculaire reste encore à éclaircir.

L'AMPc est un second messager intracellulaire contrôlant le tonus contractile des CMLs en induisant leur relaxation (Morgado et al., 2011). Il exerce son effet vasorelaxant en modulant l'activité de nombreux effecteurs intracellulaires dont les canaux potassiques BK<sub>Ca</sub>. Ces derniers ont pour caractéristique une conductance unitaire importante et leur probabilité d'ouverture est fortement augmentée par de fortes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> et la dépolarisation (Latorre et al., 2017). Ces propriétés en font des modulateurs privilégiés de l'homéostasie calcique. En effet, les canaux BK<sub>Ca</sub> sont exprimés dans de nombreux tissus dont le muscle lisse où ils s'opposent à la contraction et ont un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression artérielle (Brenner et al., 2000; Nelson et al., 1995).

Les concentrations de l'AMPc sont finement régulées par les PDEs. Les familles de PDE3 et PDE4 constituent les principales familles qui hydrolyse l'AMPc au niveau vasculaire (Hubert

et al., 2014). De plus, leur rôle fonctionnel dans la régulation du tonus vasculaire par l'AMPc a été démontré dans plusieurs lits vasculaires de plusieurs espèces dont l'artère coronaire humaine (Lindgren and Andersson, 1991b), porcine (Kaneda et al., 2010) et de rat (Lindgren and Andersson, 1991b).

Si la contribution des PDEs de l'AMPc dans le contrôle du tonus vasculaire est de mieux en mieux établie, les effecteurs mis en jeu dans cette régulation restent peu connus. Les études récentes réalisées sur le cardiomyocyte (Lehnart et al., 2005; Leroy et al., 2011) ont fait émerger un nouveau paradigme selon lequel d'importants effecteurs de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire seraient spécifiquement régulés par certaines PDEs, localisées au sein de «plateformes» de signalisation. Ainsi, ces « signalosomes » permettraient une compartimentation différentielle de la voie de l'AMPc dans les différents points clé de la cellule. Néanmoins, un tel paradigme n'a jamais été décrit quant à la régulation de la contractilité de la CMLV.

De manière intéressante, des travaux récents ont cependant mis en lumière un mécanisme original de régulation des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  par la PDE3 et PDE4 dans le muscle lisse de vessie de rongeurs (Brown et al., 2008; Xin et al., 2014a; Zhai et al., 2014a). En effet, l'inhibition de la PDE4 provoque dans ce tissu une relaxation musculaire associée à une augmentation de l'activité des canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , selon un mécanisme dépendant de la PKA.

Ce projet a pour objectif général d'explorer l'existence de ces mécanismes dans l'artère coronaire de rat d'abord sur le plan physiologique (partie 1), puis en situation pathologique d'IC (partie 2). Dans la première partie de ce projet, nous avons d'abord confirmé que les PDE3 et PDE4 étaient les principales familles de PDE qui hydrolyse l'AMPc dans l'artère coronaire gauche de rat. Par une approche pharmacologique, sur des artères isolées, nous avons évalué l'effet des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 sur le tonus coronaire basal puis sur la voie relaxante de l'AMPc produit de façon stimulée. L'utilisation d'un bloqueur sélectif des  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  a permis d'évaluer l'implication de ces canaux dans cette voie de régulation. Ce mécanisme moléculaire a par la suite été confirmé à l'échelle de la CML d'artère coronaire par la mesure de l'activité électrique du canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en présence d'inhibiteur de PDE3 et PDE4. Enfin, par une approche immunohistochimique, nous avons exploré l'existence d'une association moléculaire entre le  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , la PDE3/PDE4.

Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons étudié les altérations de cette voie de signalisation dans l'IC. Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'IC induite par sténose de l'aorte ascendante, 22 semaines après opération des rats. Par une approche pharmacologique,

nous avons évalué le rôle des BK<sub>Ca</sub> dans la régulation du tonus coronaire par les PDE3 et PDE4 chez les rats atteints d'IC comparés aux contrôles. Par la suite, l'utilisation d'une approche biochimique par la technique de Western blot a permis d'étudier l'expression protéiques de certains isoformes de de PDE3 et PDE4 et du canal BK<sub>Ca</sub>. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'impact de la pathologie sur l'association moléculaire entre le BK<sub>Ca</sub> et les PDE3 et PDE4.

La majeure partie des résultats a été regroupé sous forme d'un article inséré ci-après. Des résultats complémentaires seront présentés de façon séparés à la suite de l'article.

## **2. Résultats**

### **2.1. Article « Contribution of BK<sub>Ca</sub> channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure »**

Sarah Idres<sup>1</sup>, Germain Perrin<sup>1</sup>, Valérie Domergue<sup>2</sup>, Florence Lefebvre<sup>1</sup>, Rodolphe Fischmeister<sup>1</sup>, Véronique Leblais<sup>1</sup> and Boris Manoury<sup>1</sup>.

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

2: UMS IPSIT, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

Article soumis.

# Cardiovascular Research

## Contribution of BK(Ca) channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure --Manuscript Draft--

|                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Full Title:</b>                                   | Contribution of BK(Ca) channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Short Title:</b>                                  | BKCa-mediated PDE regulation of artery tone                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Article Type:</b>                                 | Original Article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Keywords:</b>                                     | BK(Ca) channel; phosphodiesterase; cAMP; coronary artery; heart failure                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Corresponding Author:</b>                         | Boris Manoury<br>Université Paris-Sud, Université Paris Saclay<br>Châtenay-Malabry, FRANCE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Corresponding Author Secondary Information:</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Corresponding Author's Institution:</b>           | Université Paris-Sud, Université Paris Saclay                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>First Author:</b>                                 | Sarah Idres, PharmD, MSc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>First Author Secondary Information:</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Order of Authors:</b>                             | Sarah Idres, PharmD, MSc<br>Germain Perrin, PharmD, MSc<br>Valérie Domergue, MSc<br>Florence Lefebvre<br>Rodolphe Fischmeister, PhD<br>Véronique Leblais, PharmD, PhD<br>Boris Manoury, PhD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Order of Authors Secondary Information:</b>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Abstract:</b>                                     | <p><b>Aims</b><br/>Regulation of vascular tone by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) involves many effectors, including the large conductance, Ca(2+)-activated, K(+) (BK(Ca)) channels. In arteries, cAMP is mainly hydrolyzed by type 3 and 4 phosphodiesterases (PDE3, PDE4). Here, we examined the specific contribution of BK(Ca) channels to tone regulation by these PDEs in rat coronary arteries, and how this is altered in heart failure.</p> <p><b>Methods and Results</b><br/>Concomitant application of PDE3 (cilostamide) and PDE4 (Ro-20-1724) inhibitors increased BK(Ca) single-channel activity in isolated myocytes from rat coronary arteries. Myography was conducted in isolated, U46619-contracted coronary arteries. Cil or Ro induced a vasorelaxation that was greatly reduced by iberiotoxin, a BK(Ca) channel blocker. Ro and Cil potentiated the relaxation induced by the <math>\beta</math>-adrenergic agonist isoprenaline or the adenylyl cyclase activator L-858051. Iberiotoxin abolished the effect of PDE inhibitors on isoprenaline but did not on L-858051. In coronary arteries from rats with heart failure induced by aortic stenosis, iberiotoxin had no more effect on Ro-20-1724- and cilostamide- induced vasorelaxations. Expression of the BK(Ca) channel <math>\alpha</math>-subunit was lower in heart failure compared to sham coronary arteries and that of a 70 kDa PDE4B was increased. Proximity ligation assays demonstrated that PDE3 and PDE4 were localized in the vicinity of the channel. The [BK(Ca)-PDE4B] duplex was less abundant in heart failure.</p> <p><b>Conclusion</b></p> |

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                             | BK(Ca) channels mediate the relaxation of coronary artery induced by PDE3 and PDE4 inhibition. This is achieved by co-localization of both PDEs with BK(Ca) channels, enabling tight control of cAMP available for channel opening. Contribution of the channel is prominent at rest and on $\beta$ -adrenergic stimulation. This coupling is lost in heart failure. |
| <b>Suggested Reviewers:</b> | Donald H Maurice, PhD<br>Professor, Queen's University, School of Medicine<br>mauriced@queensu.ca<br>Expertise in the field of vascular PDEs                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Opposed Reviewers:</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

## **Contribution of BK<sub>Ca</sub> channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure**

Sarah Idres, Germain Perrin, Valérie Domergue, Florence Lefebvre, Rodolphe Fischmeister, Véronique Leblais and Boris Manoury.

### **Abstract**

#### **Aims**

Regulation of vascular tone by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) involves many effectors, including the large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated, K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) channels. In arteries, cAMP is mainly hydrolyzed by type 3 and 4 phosphodiesterases (PDE3, PDE4). Here, we examined the specific contribution of BK<sub>Ca</sub> channels to tone regulation by these PDEs in rat coronary arteries, and how this is altered in heart failure.

#### **Methods and Results**

Concomitant application of PDE3 (cilostamide) and PDE4 (Ro-20-1724) inhibitors increased BK<sub>Ca</sub> single-channel activity in isolated myocytes from rat coronary arteries. Myography was conducted in isolated, U46619-contracted coronary arteries. Cil or Ro induced a vasorelaxation that was greatly reduced by iberiotoxin, a BK<sub>Ca</sub> channel blocker. Ro and Cil potentiated the relaxation induced by the  $\beta$ -adrenergic agonist isoprenaline or the adenylyl cyclase activator L-858051. Iberiotoxin abolished the effect of PDE inhibitors on isoprenaline but did not on L-858051. In coronary arteries from rats with heart failure induced by aortic stenosis, iberiotoxin had no more effect on Ro-20-1724- and cilostamide- induced vasorelaxations. Expression of the BK<sub>Ca</sub> channel  $\alpha$ -subunit was lower in heart failure compared to sham coronary arteries and that of a 70 kDa PDE4B was increased. Proximity ligation assays demonstrated that PDE3 and PDE4 were localized in the vicinity of the channel. The [BK<sub>Ca</sub>-PDE4B] duplex was less abundant in heart failure.

#### **Conclusion**

BK<sub>Ca</sub> channels mediate the relaxation of coronary artery induced by PDE3 and PDE4 inhibition. This is achieved by co-localization of both PDEs with BK<sub>Ca</sub> channels, enabling tight control of cAMP available for channel opening. Contribution of the channel is prominent at rest and on  $\beta$ -adrenergic stimulation. This coupling is lost in heart failure.

Dr Boris Manoury  
INSERM UMR-S 1180  
Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay  
5, rue J.B. Clément  
92296 Châtenay-Malabry  
France

July the 28<sup>th</sup>, 2017

To: the Editor, Cardiovascular Research

We wish the attached manuscript entitled “Contribution of BK<sub>Ca</sub> channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure” to be considered for publication in Cardiovascular Research. The paper demonstrates that BK<sub>Ca</sub> channels mediate the relaxation of coronary artery induced by type-3 and 4 phosphodiesterases. This is achieved by co-localization of both PDEs with BK<sub>Ca</sub> channels, enabling tight control of cAMP available for channel opening. Interestingly, we show that contribution of the channel varies according to the mode of cAMP stimulation and that it is lost in heart failure.

These data provide new insights on how regulation of a cAMP effector by PDEs translates into fine-tuning of the vascular tone. Moreover, our study provides an unprecedented observation of an altered coupling between vascular PDEs and a cAMP effector, namely the BK<sub>Ca</sub> channel, in a cardiovascular disorder.

This manuscript, or part of it, has neither been published (except in the form of an abstract or an academic thesis) nor is currently under consideration for publication by any other journal.

All authors have seen the final version of the manuscript and approved its submission to Cardiovascular Research.

Sincerely,

Boris Manoury

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Boris Manoury', written in a cursive style.



**Contribution of BK<sub>Ca</sub> channels to vascular tone regulation by PDE3 and PDE4 is lost in heart failure**

Sarah Idres<sup>1</sup>, Germain Perrin<sup>1,3</sup>, Valérie Domergue<sup>2</sup>, Florence Lefebvre<sup>1</sup>, Rodolphe Fischmeister<sup>1</sup>, Véronique Leblais<sup>1</sup> and Boris Manoury<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>: INSERM UMR-S 1180, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

<sup>2</sup>: UMS IPSIT, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

<sup>3</sup>: current address: Hôpital Européen Georges Pompidou, Université René Descartes

Short title:

BK<sub>Ca</sub>-mediated PDE regulation of artery tone

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

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

Keywords: BK<sub>Ca</sub> channel, phosphodiesterase, cAMP, coronary artery, heart failure

Word count: 6845

Total number of figures and tables: 6 main Figures and 5 Supplemental Figures.

**Abstract****Aims**

Regulation of vascular tone by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) involves many effectors, including the large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated, K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) channels. In arteries, cAMP is mainly hydrolyzed by type 3 and 4 phosphodiesterases (PDE3, PDE4). Here, we examined the specific contribution of BK<sub>Ca</sub> channels to tone regulation by these PDEs in rat coronary arteries, and how this is altered in heart failure.

**Methods and Results**

Concomitant application of PDE3 (cilostamide) and PDE4 (Ro-20-1724) inhibitors increased BK<sub>Ca</sub> single-channel activity in isolated myocytes from rat coronary arteries. Myography was conducted in isolated, U46619-contracted coronary arteries. Cil or Ro induced a vasorelaxation that was greatly reduced by iberiotoxin, a BK<sub>Ca</sub> channel blocker. Ro and Cil potentiated the relaxation induced by the  $\beta$ -adrenergic agonist isoprenaline or the adenylyl cyclase activator L-858051. Iberiotoxin abolished the effect of PDE inhibitors on isoprenaline but did not on L-858051. In coronary arteries from rats with heart failure induced by aortic stenosis, iberiotoxin had no more effect on Ro-20-1724- and cilostamide- induced vasorelaxations. Expression of the BK<sub>Ca</sub> channel  $\alpha$ -subunit was lower in heart failure compared to sham coronary arteries and that of a 70 kDa PDE4B was increased. Proximity ligation assays demonstrated that PDE3 and PDE4 were localized in the vicinity of the channel. The [BK<sub>Ca</sub>-PDE4B] duplex was less abundant in heart failure.

**Conclusion**

BK<sub>Ca</sub> channels mediate the relaxation of coronary artery induced by PDE3 and PDE4 inhibition. This is achieved by co-localization of both PDEs with BK<sub>Ca</sub> channels, enabling tight control of cAMP available for channel opening. Contribution of the channel is prominent at rest and on  $\beta$ -adrenergic stimulation. This coupling is lost in heart failure.

### Abbreviations

AC: adenylyl cyclase

$\alpha$ -s.u.:  $\alpha$ -(pore forming) subunit of the BK<sub>Ca</sub> channel

$\beta$ -AR: beta-adrenergic receptor

BK<sub>Ca</sub>: large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel

CA: coronary artery

cAMP: 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate

cGMP: 3', 5'-cyclic guanosine monophosphate

Cil: cilostamide

EPAC: exchange protein directly activated by cAMP

IBTX: iberiotoxin

ISO: isoprenaline

HF: heart failure

LADCA: left anterior descending coronary artery

PDE: cAMP phosphodiesterase

PLA: proximity ligation assay

PKA: protein kinase A

PKG: protein kinase G

PP: patch potential

Ro: Ro-20-1724

RyR: ryanodine receptor

VSMC: vascular smooth muscle cell

## Introduction

Impairment of coronary perfusion is an important feature in cardiac hypertrophy and failure<sup>1-3</sup>. Abnormal coronary flow in heart failure (HF) may originate from arterial wall remodeling and vascular rarefaction. In addition, impaired vasoactive signaling, including endothelial-dependent vasodilatation but also relaxant responses initiated by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-elevating agents<sup>4-6</sup>, have been reported in patients with chronic HF<sup>2, 4</sup> and animal models of HF<sup>5-7</sup>.

Production of cAMP is achieved by adenylyl cyclase (AC), while its hydrolysis is catalyzed by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). There are 11 described families of PDEs that encompass 21 genes and a myriad of variants<sup>8</sup>. PDE3 and PDE4 are classically reported to contribute for the major part of the Ca<sup>2+</sup>-independent, cAMP-PDE activity in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from various species<sup>9, 10</sup>. Selective pharmacological inhibition of PDE3 or PDE4 is well known to elevate cAMP concentration in tissue<sup>10, 11</sup> and to promote relaxation of VSMCs in various vascular beds, including coronary arteries<sup>11-13</sup>. This response is generally considered to be mediated by PKA<sup>14</sup>, although cross-activation of PKG<sup>15</sup> and stimulation of EPAC<sup>16, 17</sup> are also documented. The potential downstream mechanisms that can be targeted by these pathways are numerous, ranging from Ca<sup>2+</sup> handling to decrease of sensitivity to Ca<sup>2+</sup><sup>14</sup>.

Nevertheless, it remains unclear whether PDE3 and PDE4 control evenly cAMP concentrations in all compartments of VSMCs, or rather work by restricting cAMP in the vicinity of some particular effectors that would be predominant for the relaxing effect evoked by PDE inhibition. Importantly, evidence gathered by our laboratory and others in various models suggest that specific PDE subfamilies are non-uniformly localized near discrete cellular effectors and thus delineate restricted compartments that hinder the spreading of cAMP<sup>18</sup>. According to this paradigm, such a compartmentalization would allow fine tuning of cAMP signals, and disorganization of these signaling platforms in disease might jeopardize cellular homeostasis<sup>18</sup>. In blood vessels, the actual existence of tone-regulating signaling domains that would include PDE3 and PDE4 remains elusive. Although already examined in the endothelial cells<sup>8</sup>, the potential tethering of PDE with molecular effectors of the cAMP pathway has never been investigated in contractile vascular smooth muscle layer.

Large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) channels are key regulators of vascular and non-vascular smooth muscle tone<sup>19-21</sup>. Activation of BK<sub>Ca</sub> channels by intracellular Ca<sup>2+</sup> influx or local and transient Ca<sup>2+</sup> release from the ryanodine receptor (i.e. Ca<sup>2+</sup> sparks)<sup>21, 22</sup> repolarizes membrane potential, limiting Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-gated channels and

hence contraction of the VSMCs. In addition, BK<sub>Ca</sub> channels are well documented cellular effectors of cAMP signaling in VSMCs: i) pharmacological inhibition of BK<sub>Ca</sub> channels reduces the relaxing effect of cAMP-elevating agents<sup>23, 24</sup>; ii) the BK<sub>Ca</sub> current is enhanced by such agents, an effect that may either be promoted directly by phosphorylation<sup>19</sup>, or indirectly via potentiation of Ca<sup>2+</sup> sparks<sup>24, 25</sup>. Of note, BK<sub>Ca</sub> channel activity was reported to be depressed in several animal models of cardiovascular disorders<sup>20</sup> including HF<sup>26</sup>.

Because the BK<sub>Ca</sub> channel is a target of the cAMP pathway with pivotal role in regulation of vasomotricity, we tested the hypothesis that BK<sub>Ca</sub> channels are key effectors by which PDE3 and PDE4 control vascular tone. We explored the modalities of such a coupling, and how this is impacted by the establishment of HF.

## Materials and Methods

An expanded detailed version of Materials and Methods is available online.

### Animals and surgical procedures

All animal care and experimental procedures conformed to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament) and authorizations to perform animal experiments according to application decrees were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (No. D-92-283, 13 December 2012). Aortic stenosis was mimicked in rats under anaesthesia and analgesia, by placing a stainless steel hemoclip (0.6 mm-internal diameter) on the ascending aorta via thoracic incision, as previously described<sup>27</sup>. Age-matched sham animals underwent the same procedure without placement of the clip. The surgical procedure was carried out on 3-week-old rats, under anaesthesia with a ketamine-xylazine mix (75 mg/kg – 10 mg/kg, respectively, 0.3 mL/100g, i.p.). Buprenorphine chlorhydrate (0.2 mL/100g, s.c.) was administered twice daily for 3 days beginning at the end of the surgery. Operated animals were sacrificed 22 weeks after surgery, using sodium pentobarbital (150 mg/kg, i.p.).

### Coronary artery isolation and smooth muscle cells preparation

All rats were anesthetized by injection of pentobarbital (150 mg/kg, i.p.). The left anterior descending coronary artery (LADCA, inner diameter 100–300 µm) was carefully isolated and either freshly used for vascular reactivity, submitted to digestion steps in order to obtain isolated smooth muscle cells (SMCs) used for patch clamp or *in situ* immunolabelling, or immediately frozen for biochemical analysis.

### **cAMP-PDE activity assay**

cAMP-PDE activity was measured by a radioenzymatic assay according to the method reported by Thompson and Appleman<sup>28</sup> and adapted to vascular tissue<sup>7</sup>. Reactions were carried out with or without inhibitors of PDEs, namely 100 µmol/L IBMX, as a non-selective PDE inhibitor, 1 µmol/L Cil, as a selective PDE3 inhibitor<sup>29</sup> and 10 µmol/L Ro, as a selective PDE4 inhibitor<sup>30</sup>. IBMX-sensitive PDE activity, PDE3 and PDE4 activities were defined as the fraction of total activity that was inhibited by corresponding inhibitor.

### **Vascular reactivity measurement**

Assessment of vascular reactivity in response to PDE inhibitors, ion channel inhibitors and vasorelaxant agonists was conducted in segments of LADCA mounted on a small vessel myograph (DMT, Aarhus, Denmark), as previously described<sup>31</sup>. Chambers were filled with Krebs solution, bubbled with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> mixture and warmed at 37°C. Each vessel was set at an internal circumference corresponding to 90% of the circumference the vessel would have if submitted to a transmural pressure of 100 mmHg (13.3 kPa). Contractile capacity was evaluated by challenging the vessels with 80 mmol/L KCl -modified Krebs solution (K80). Endothelial function was evaluated in all vessels by measurement of the relaxant effect induced by 1 µmol/L acetylcholine (Ach) following contraction with the thromboxane A<sub>2</sub> mimetic U46619. In experiments set out to study the vasorelaxant effect of PDE inhibition, the rings were contracted with U46619 (0.3-1 µmol/L), targeting ~100% of the amplitude obtained with K80 challenge. Once steady contraction was obtained, 1 µmol/L Cil was added. To study additional effect of PDE4 inhibition, PDE4 inhibitor Ro (10 µmol/L) was added on top of Cil. In other vessels, Ro was applied first and Cil was then added on the top. In other experiments, vasorelaxant agonists were added on U46619-contracted vessels in a stepwise, cumulative fashion to establish concentration-response curve (CRC). When addressing the role of ion channels or PDEs in relaxant responses, inhibitors or relevant vehicle were applied during 15 min before U46619. Contractile responses were expressed in mN/mm and relaxant responses were expressed in %, relative to the contraction amplitude obtained with U46619.

### **Patch clamp**

Single channel recording was performed in freshly isolated LADCA SMCs, using either cell-attached or inside-out configurations of the patch clamp technique<sup>32</sup>. Patch pipette had a resistance of 2-5 MOhm. Cells were allowed to settle 5-10 min on the bottom of a Petri and covered by of extracellular bath solution<sup>33</sup> (mmol/L: KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 10, CaCl<sub>2</sub> 0.1, Hepes 10, D-glucose 30, pH=7.2 adjusted with KOH). High K<sup>+</sup> concentration in the bath was used to clamp cell membrane potential close to 0 mV. Experiments were conducted at room

temperature (20-23°C). For cell-attached recordings, pipette solution<sup>33</sup> contained (mmol/L): KCl 5, NaCl 110, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, Hepes 10, pH=7.4 adjusted with NaOH. In some experiments, 0.1 µmol/L IBTX was added in the pipette solution. A gigaseal was obtained and current was recorded at patch potential (PP) of 40 mV. Perfusion with PDE inhibitors was started after the vehicle (DMSO 0.03%) had been perfused for 2-5 min and channel activity was stable. Channel activity was analyzed using PClamp 10 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) which gave average channel open state activity (NP<sub>o</sub>, number of channels x open probability) and mean unitary current level amplitude. Analysis was performed over a 0.5 to 5 min period of continuous recording during stable channel activity. For inside-out recordings, pipette contained (mmol/L): KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, Hepes 10, pH=7.4 adjusted with KOH. Several PP were tested to build up the current-PP relationship of the conductance detected.

### **Western Blot analysis**

Western blotting was performed as previously described using other vascular tissues<sup>7</sup>. Protein samples were prepared in standard loading buffer containing β-mercaptoethanol 2.5% (v/v) and heated at 95°C for 5 min except for BK<sub>Ca</sub> detection. Following primary antibodies were used: rabbit anti-PDE3A (1/10000; kind gift from Dr. Chen Yan, University of Rochester Medical Center, NY, USA), anti-PDE4A (1/5000); rabbit anti-PDE4B (1/1000), anti-PDE4D (1/1000), kind gifts from Dr. Marco Conti (University of California, San Francisco, CA, USA); and a mouse anti-BK<sub>Ca</sub> α-subunit (α-s.u. 1/500; #75-022, purchased from University of California Davis/NIH. GAPDH was used for normalization. Results were expressed relatively to the mean expression level in the sham group.

### **Proximity ligation assay (PLA)**

PLA protocol was carried out according to the recommendation of manufacturer (Duolink® PLA, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) using freshly isolated LADCA SMCs seeded on a coverslip and fixed in 4% paraformaldehyde. Following primary antibodies were used at the indicated dilutions: above-mentioned anti-BK<sub>Ca</sub> α-s.u. (1/300), anti-PDE3A (1/400), anti-PDE4B (1/100), or a pan-PDE4 (rabbit, 1/100; #PD4-101AP, FabGennix, Frisco, TX, USA). Preparations were incubated overnight at 4°C with the anti-BK<sub>Ca</sub> α-s.u. antibody and one type of anti-PDE antibody (100 µL). Preparations incubated with only one antibody were used as negative control. After washing, incubation of relevant secondary antibodies, ligation and amplification were performed. PLA images were acquired with a laser scanning confocal microscope (excitation: 554 nm; emission: 579 nm), using similar parameters for all slides testing a given antibody association. Using the ImageJ 1.50b software all single cell images corresponding to one given couple of antibodies were converted into 8-bit and

binarized using a common threshold value. Threshold value was set arbitrarily to clearly discriminate fluorescence puncta from background. Results were expressed as the percentage of cell area covered by PLA signal. This technique allows to detect co-localization of proteins in a 40 nm range.

### **Data and statistical analysis**

CRCs obtained for each vessel were fitted with the Hill equation using Prism 7 software (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) and pharmacological parameters, namely pD<sub>2</sub> and maximal effect (E<sub>max</sub>), were obtained. Data were expressed as mean ± SEM. N represented the number of rats while n represented the number of cells in electrophysiology and PLA experiments. Two-group comparisons were performed using non-parametric Mann and Whitney test, except for paired comparisons that were performed using the Wilcoxon signed-rank paired test. In comparisons involving more than 2 groups, 1-way ANOVA followed by Holm-Sidak multiple comparison post-test was used. When comparing the effect of IBTX in sham and HF animals, 2-way ANOVA was used. Comparison of CRCs was performed using 2-way ANOVA for repeated measures. Values of P<0.05 were considered for statistical significance.

## **Results**

### **Characterization of PDE3 and PDE4 activity in rat coronary artery**

Because previous studies<sup>7, 10</sup> demonstrated that PDE3 and PDE4 were the most abundant cAMP-PDEs in vasculature, we first verified their respective contributions in rat left anterior descending coronary artery (LADCA). Total cAMP-hydrolyzing activity amounted to 76±11 pmol/min/mg (N=7 with tissue collected from 23 rats). Selective PDE3 inhibitor, cilostamide (Cil, 1 µmol/L)<sup>29</sup>, and selective PDE4 inhibitor, Ro-20-1724 (Ro, 10 µmol/L)<sup>30</sup>, inhibited 55±5% and 33±2% of the total PDE activity, respectively (N=5-6). In comparison, the non-selective PDE inhibitor, IBMX (100 µmol/L) decreased the total PDE activity by 91±3% (N=4). These results confirm that PDE3 and PDE4 are the main contributors to cAMP hydrolysis in rat LADCA.

### **BK<sub>Ca</sub> channels largely contribute to vasorelaxation induced by PDE3 and PDE4 inhibition**

To address whether vasoactive effects of PDE3 and PDE4 inhibition are mediated by BK<sub>Ca</sub> channels, we applied Ro or Cil on rat LADCA mounted on a wire-myograph and contracted with U46619 (a thromboxane A<sub>2</sub> receptor agonist, 0.3-1 µmol/L), in the presence or absence



of IBTX (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), a selective BK<sub>Ca</sub> channel inhibitor<sup>34</sup>. Figure 1 shows that Cil and Ro relaxed contracted LADCA on average by  $43\pm 13\%$  and  $24\pm 6\%$ , respectively. Both Ro and Cil effects were greatly blunted by IBTX. Furthermore, joint addition of Cil and Ro induced a synergistic relaxation which was still significantly decreased by  $\approx 50\%$  upon IBTX pretreatment. These results provided evidence that, in rat LADCA, the vasorelaxant effect of PDE3 or PDE4 inhibitors involves activation of BK<sub>Ca</sub> channels. In contrast, neither 1 mmol/L 4-AP, a broad inhibitor of K<sub>v</sub> channels, nor the K<sub>ATP</sub> channel blocker glibenclamide (10  $\mu\text{mol/L}$ ) affected the relaxant effect promoted by combined Cil and Ro (Suppl. Figure IA). These data suggest that the relaxing effects of Ro and Cil in rat LADCA require specific activity of BK<sub>Ca</sub> channel. Also, IBTX was still as effective in inhibiting relaxant response to combined Ro and Cil in LADCA rings where the endothelium had been voluntarily deteriorated (Suppl. Figure IB), showing that the coupling between PDE3/4 and BK<sub>Ca</sub> channel take place in the smooth muscle layer and is not influenced by endothelium-derived components.

Ca<sup>2+</sup> sparks can activate BK<sub>Ca</sub> channels and regulate smooth muscle tone<sup>22</sup>. Thus, to address the relevance of this pathway in the relaxant effect of PDE3/4 inhibition in rat LADCA, we repeated the above protocol using high concentration of ryanodine (30  $\mu\text{mol/L}$ ) to prevent Ca<sup>2+</sup> release from internal stores via the ryanodine receptor (RyR) (Suppl. Figure IA). We found that, in contrast to IBTX, ryanodine did not significantly alter the relaxant responses induced by Cil and Ro. This indicates that BK<sub>Ca</sub> channel regulation by Ca<sup>2+</sup> sparks is not a prominent mechanism in the relaxation induced by PDE3/4 inhibitors in rat LADCA.

### **Simultaneous inhibition of PDE3 and PDE4 increased single BK<sub>Ca</sub> channel activity**

In order to verify whether PDE3 and PDE4 control the activity of BK<sub>Ca</sub> channels, we examined the effect of inhibition of PDE3 or PDE4 on single BK<sub>Ca</sub> channel activity in freshly isolated LADCA SMCs. Using inside-out patches in symmetrical [K<sup>+</sup>] and bath with high [Ca<sup>2+</sup>] (0.1 mmol/L), a unitary conductance of 221 pS was measured, consistent with properties of BK<sub>Ca</sub> channel in VSMCs (Suppl. Figure IIA). Using the cell-attached configuration of the patch-clamp technique and physiological K<sup>+</sup> gradient, single channel activity was observed in most membrane patches and was dramatically silenced when pipette solution contained IBTX (Suppl. Figure IIB), strongly supporting that this conductance was carried by BK<sub>Ca</sub> channels. Average unitary current amounted to  $5.0\pm 0.4$  pA, at a patch potential (PP) of 40 mV, and the channel open state probability NP<sub>o</sub> averaged to  $0.019\pm 0.006$  (n=34), consistent with other reports in similar conditions<sup>15</sup>. Figure 2 shows the effects of PDE3 and PDE4 inhibition on channel activity in cell-attached patches. Ro clearly increased NP<sub>o</sub> (i.e. >1.5-fold) only in 1 out of 6 patches, while this was observed in 2 out of 6 patches

with Cil. Overall NP<sub>o</sub> was not significantly changed when cells were perfused with Cil or Ro alone. However, simultaneous perfusion with Ro and Cil significantly increased NP<sub>o</sub> (increase in 8 out of 11 patches). Thus BK<sub>Ca</sub> channel activity can be regulated by PDE3 and PDE4.

### **BK<sub>Ca</sub> channels participate in the potentiating effect of PDE3 and PDE4 inhibitors on the vasorelaxation induced by $\beta$ -adrenergic or AC stimulation**

So far, we have shown that BK<sub>Ca</sub> channels are key players in the relaxing effect of PDE inhibitors on rat LADCA rings under resting cAMP level. In order to investigate the relevance of this phenomenon under stimulation of the cAMP pathway, the response of LADCA to isoprenaline (ISO), a  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) agonist, was examined. ISO induced a concentration-dependent relaxation of LADCA rings ( $pD_2=7.7\pm0.1$ ,  $E_{max}=90\pm4\%$ , Figure 3A). Both PDE4 and PDE3 inhibition shifted the concentration-response curve of ISO to the left and increased its  $pD_2$  value to  $8.3\pm0.1$  and  $8.2\pm0.1$ , respectively ( $P<0.01$  for both), indicating a potentiating effect (Figure 3A and C). Pretreatment with IBTX reduced the  $E_{max}$  of ISO response to  $54\pm4\%$  ( $P<0.001$ ) but not its  $pD_2$  ( $7.6\pm0.1$ ; Figure 3B and D). Interestingly, Ro had no effect on ISO response in the presence of IBTX (Figure 3B). Cil still slightly left-shifted ISO response although the two CRCs were not significantly different (Figure 3D). These results indicate that BK<sub>Ca</sub> channels are important effectors of the  $\beta$ -adrenergic vasorelaxation. They further highlight a key role of BK<sub>Ca</sub> channels in mediating the potentiating effect of PDE4 inhibition and PDE3 inhibition on this  $\beta$ -adrenergic response.

We also studied the effects of PDE3 and PDE4 inhibition on the response to a direct AC activator, L-858051 (L-85, a hydrophilic forskolin analog). L-85 induced a concentration-dependent relaxation ( $pD_2=6.5\pm0.1$ ) which was potentiated by Ro and Cil ( $pD_2=7.1\pm0.1$ ,  $P<0.001$ , and  $6.8\pm0.1$ ,  $P<0.05$ , respectively; Figure 3E and G). IBTX hampered the response to L-85, by decreasing its  $pD_2$  value to  $5.9\pm0.1$  ( $P<0.001$ ; Figure 3F and H). Interestingly, Cil and Ro still potentiated L-85 response in the presence of IBTX (Figure 3F and H). These data indicate that the potentiating effect of PDE3/4 inhibitors on the vasorelaxant response to direct AC stimulation does not require functional BK<sub>Ca</sub> channels.

### **The coupling of BK<sub>Ca</sub> channels with PDE3 and PDE4 is functionally absent in HF LADCA**

We then explored whether the above-described coupling between BK<sub>Ca</sub> channels and PDE3/4 is altered in HF situation, by using a rat model of chronic cardiac pressure overload, inducing left ventricular hypertrophy with major cardiac dysfunction<sup>7</sup>. Heart and lung weights were dramatically increased in 25-week-old rats with aortic stenosis compared to sham-operated rats, confirming that congestive HF was established in this group (Suppl. Figure III).

LADCA isolated from HF rats (HF-LADCA) showed decreased contractile capacity to both K80 and U46619 (1  $\mu$ mol/L), compared to LADCA isolated from sham rats (Suppl. Figure IVA). Moreover, HF-LADCA displayed a significant reduction of the relaxant effect of Ach, an archetypical endothelium-mediated response, in comparison with sham (Suppl. Figure IVB). Thus HF-LADCA are characterized by an alteration of their contractile capacity, accompanied by signs of endothelial dysfunction.

As shown above in younger rats, Ro and Cil relaxed sham-LADCA and these effects were prevented by IBTX (Figure 4). By contrast, the relaxant response to Ro was much smaller in HF-LADCA and not affected by IBTX (Figure 4A). Interestingly, Cil evoked a robust relaxation in HF-LADCA but this was insensitive to IBTX (Figure 4B). Furthermore, upon simultaneous application of Ro and Cil, synergistic relaxant responses were observed in both HF- and sham-LADCA but the response was depressed by IBTX in sham-LADCA only (Figure 4C). Therefore, contribution of BK<sub>Ca</sub> channel to the relaxing effect of PDE3/4 inhibition is lost in HF-LADCA.

### **Expression level of BK<sub>Ca</sub> $\alpha$ -subunit, PDE3 and PDE4 in HF-LADCA**

In order to provide a molecular basis that would explain this last result, we then sought to characterize the expressions of BK<sub>Ca</sub> channel and PDE3/4 in sham- and HF-LADCA (Figure 5). The pore-forming  $\alpha$ -subunit ( $\alpha$ -s.u.) of the BK<sub>Ca</sub> channel was about half-decreased in HF- compared to sham-LADCA (Figure 5A). Quantification of PDE3A, PDE4A and PDE4D did not reveal significant difference between HF and sham (Figure 5B, C and E). In contrast, a robust, significant 4-fold increase in the amount of a 70 kDa PDE4B isoform was found in HF- compared to sham-LADCA (Figure 5D).

### **Proximity between PDE3/4 isoforms and BK<sub>Ca</sub> channels**

In order to reveal whether PDE isoforms localize in the vicinity of BK<sub>Ca</sub> channels, experiments using PLA were performed in SMCs freshly isolated from either HF- or sham-LADCA. In sham-LADCA SMCs, PLA signals were detected by using the antibody against the  $\alpha$ -s.u. of the BK<sub>Ca</sub> channel associated with either a PDE3A antibody, a pan-specific PDE4 antibody (documented to detect PDE4A and PDE4D isoforms) or a PDE4B antibody (Figure 6). Controls incubated with only one of these antibodies showed no signal except for the pan-specific PDE4 antibody (Suppl. Figure V). However, this signal was considered to be negligible compared to the signal obtained by coupling with anti-BK<sub>Ca</sub> antibody. Quantification revealed a significant decrease of the [BK<sub>Ca</sub>-PDE4B] PLA duplexes in HF-LADCA cells, while other configurations showed no significant change (Figure 6).

## Discussion

Here, we addressed the extent and modalities of the contribution of BK<sub>Ca</sub> channels in mediating the vasodilating properties of PDE3 and PDE4 inhibitors. This was performed using rat epicardial arteries isolated from either healthy rats or animals with severe HF. We report novel findings: (i) The existence of a signalosome involving PDE3/4 and BK<sub>Ca</sub> channels is supported by PLA data that revealed *in situ* spatial proximity between PDE isoforms and the channel within a 40 nm range. (ii) PDE3 and PDE4 control BK<sub>Ca</sub> channel activity. (iii) The relative contribution of BK<sub>Ca</sub> channel to the relaxing effects of selective PDE inhibitors depends on the mode of cAMP production. (iv) Inhibition of the RyR did not affect the relaxant responses to PDE3 or PDE4 inhibition. (v) In a HF model, the contribution of BK<sub>Ca</sub> channel to the regulation of coronary tone by PDE3 and PDE4 disappeared, although PDE3 and PDE4 inhibitors were still able to relax the vessels. This was associated with decreased expression of BK<sub>Ca</sub> channel  $\alpha$ -s.u. and less abundant BK<sub>Ca</sub> channel interactions with PDE4B. Altogether, these data provide new insights on how regulation of a specific cAMP effector by PDEs translates into fine-tuning of the vascular tone. Moreover, our study provides an unprecedented observation of an altered coupling between vascular PDEs and a cAMP effector, namely the BK<sub>Ca</sub> channel, in a cardiovascular disorder.

Effects obtained with PDE3 and PDE4 inhibitors at selective concentrations<sup>29, 30</sup> were overall consistent with previous data obtained in various vascular beds<sup>7, 9-11, 13, 35</sup>. Using selective block with IBTX, we demonstrated that vasorelaxation by PDE3 or PDE4 inhibition in rat LDCA mostly depended on BK<sub>Ca</sub> channel activity. Few studies formerly explored such participation of BK<sub>Ca</sub> channels in the relaxation evoked by PDE3/4 inhibition in other vascular beds from different species. Regarding PDE3 inhibition, BK<sub>Ca</sub> inhibitors showed either no or little effect in human or guinea-pig pulmonary artery (PA), respectively<sup>36, 37</sup>. In line with our study, Li et al.<sup>38</sup> reported that relaxation of rabbit aorta by cilostazol, a PDE3 inhibitor, was almost suppressed by the BK<sub>Ca</sub> channel blocker paxilline. Considering PDE4 inhibition, a couple of reports mentioned that the relaxant effect of rolipram was only partially inhibited by BK<sub>Ca</sub> inhibitors in human PA<sup>36</sup> and porcine coronary artery<sup>11</sup>, suggesting that the relative contribution of BK<sub>Ca</sub> channels varies among vascular beds and species.

We found that in rat LADCA SMCs, simultaneous PDE3 and PDE4 inhibition induced a clear stimulation of BK<sub>Ca</sub> single-channel activity. However, using PDE3 or PDE4 inhibitors alone was not sufficient to increase NP<sub>o</sub>. Cilostazol was recently reported to stimulate channel activity in rabbit aortic SMCs<sup>38</sup>. However, a high concentration was used (10  $\mu$ mol/L) so that the effect may also be attributed to other PDEs, such as PDE5<sup>29</sup>. Thus inhibition of a single PDE may not be sufficient for detectable increase of channel activity, most likely because of

a low basal rate of cAMP production in isolated myocytes which leads to only small or sporadic rise in cAMP concentration. At the level of the organ, however, addition of these events may sum up to generate macroscopic relaxation.

In line with earlier work focusing on other vascular beds<sup>10, 35</sup>, our data in coronary artery show that inhibitors of PDE3 and PDE4 potentiate the relaxant responses to ISO, a receptor-mediated cAMP-elevating agent, and L-85, a direct AC activator. Besides, responses to these stimulators were inhibited by IBTX, an observation consistent with previous studies<sup>23</sup>. Interestingly, BK<sub>Ca</sub> channels appeared pivotal in the effects of PDE3/4 inhibitors on  $\beta$ -adrenergic response, but not when AC was directly stimulated. This may be explained by the existence of signaling domains including PDE3/4, BK<sub>Ca</sub> channel and  $\beta$ -AR. A signalosome involving BK<sub>Ca</sub> channels,  $\beta_2$ -AR, L-type Ca<sup>2+</sup> channels and the scaffolding protein AKAP79/150, was previously characterized in VSMCs<sup>39</sup>. In other cell types, PDE3 and/or PDE4 were often detected in such macromolecular complexes<sup>18</sup>. Hence, we took advantage of the novel PLA technique to show that PDE3 and PDE4 isoforms are localized in the vicinity of BK<sub>Ca</sub> channels in LADCA SMCs. It may then be hypothesized that the PDE3 and PDE4 enzymes regulating BK<sub>Ca</sub> channels exclusively control arterial tone at low level of cAMP production and on  $\beta$ -AR stimulation. Upon direct AC stimulation, however, PDE3 and PDE4 tethered to other effectors in other domains would be increasingly engaged in controlling the “flood” of diffusing cAMP from the submembrane compartment. This would make the “IBTX-resistant” contribution more apparent upon the application of PDE inhibitors.

Since recent studies in bladder SMCs showed that PDE4 inhibition elevated BK<sub>Ca</sub> activity by stimulating Ca<sup>2+</sup> release<sup>40, 41</sup>, it was of interest to address whether this coupling was relevant in vascular SMCs. Our data did not support a major role of such a mechanism in the vasorelaxant effects of Cil and Ro in unstimulated conditions. This implies that Ca<sup>2+</sup> participating to BK<sub>Ca</sub> activation may rather originate from Ca<sup>2+</sup> influx<sup>21</sup>.

Importantly, by clear contrast with age-matched sham animals, BK<sub>Ca</sub> channels did not mediate the relaxant effect of PDE3 and PDE4 inhibitors in arteries from HF rat. This indicates that the relaxation was mediated by other mechanisms than BK<sub>Ca</sub> channels activation, which may include action on other ion channels, increased Ca<sup>2+</sup> pumping, decreased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the myosin light chain phosphorylation, or uncoupling of contractile machinery<sup>14</sup>. A straightforward explanation would be that collapse of the IBTX-sensitive contribution was a direct consequence of the decrease of the amount of BK<sub>Ca</sub> channel  $\alpha$ -s.u. observed in HF-LADCA. Such a down-regulation of BK<sub>Ca</sub> channel expression was previously described in mesenteric arteries from mice which developed HF following myocardial infarction<sup>26</sup> and in other models of cardiovascular disorders<sup>20</sup> and was generally

associated with a reduced amount of the channel  $\alpha$ - and/or  $\beta$ -s.u. Data in coronary artery, however, are scarce: a study reported no alteration of channel expression in a rat with cardiac hypertrophy following injection of ISO<sup>42</sup>. In the latter work, however, animals presented only mild remodeling, whereas the rats studied here were submitted to chronically elevated afterload and displayed dramatic cardiac hypertrophy and lung congestion.

In parallel with decreased amount of BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -s.u. in HF-LADCAs, a marked increase of a  $\approx$ 70 kDa PDE4B isoform was detected. Interestingly, this isoform was also found to be up-regulated in aorta using the same model<sup>7</sup>. In spite of the increase in PDE4B expression, we found a 50% decrease in the [BK<sub>Ca</sub>-PDE4B] duplex signal in HF which was consistent with the equivalent diminution of the BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -s.u. content, and suggests that BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -s.u. is the limiting partner for the building of the PLA duplex. The signal for [BK<sub>Ca</sub>-PDE3A] duplex was, however, not decreased. Absence of observable coupling between PDE3 and BK<sub>Ca</sub> in HF-LADCA rings may be rather explained by exacerbated PDE3 activities toward other effectors than BK<sub>Ca</sub> channel in other subcellular signalosomes that remain to be characterized.

In conclusion, this study identifies cAMP-PDE–BK<sub>Ca</sub> channel coupling as a key signaling pathway for fine tuning of vascular tone. Our results demonstrate that the contribution of this mechanism to global tone regulation by PDEs varies depending on the level of cAMP stimulation and in pathophysiological context of HF. Levels of expression BK<sub>Ca</sub> channel and PDE4B, and, additionally, interaction between both proteins may appear to be particularly impacted by the installation of HF. Further studies are needed to delineate the structural determinants of cyclic nucleotide compartmentation among various effectors in the vascular smooth muscle and how they are modified in disease.

## Funding

This work was supported by the University Paris-Sud (*Attractivité* 2013 grant to B. M.); the grant [ANR-10-LABX-33] as members of the Laboratory of Excellence LERMIT; and the French Ministère de l'Enseignement et de la Recherche for a PhD fellowship awarded to S. I.

## Acknowledgments

We are thankful to Dr Chen Yan (University of Rochester Medical Center, NY, USA), and Dr Marco Conti (University of California, San Francisco, CA, USA) for kindly providing PDE3A and PDE4A/B/D antibodies, respectively. Dr Delphine Mika and Dr Guillaume Pidoux are acknowledged for kindly providing expertise on specific protocols.

## Conflict of Interest

None declared.

## References

1. Vatner SF, Hittinger L. Coronary vascular mechanisms involved in decompensation from hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993;**22**:34A-40A.
2. Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MG, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P. Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1990;**81**:772-779.
3. Krams R, Kofflard MJ, Duncker DJ, Von Birgelen C, Carlier S, Kliffen M, ten Cate FJ, Serruys PW. Decreased coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy is related to remodeling of the coronary microcirculation. *Circulation* 1998;**97**:230-233.
4. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Yamaguchi H, Kakoi H, Takabatake Y. Vasodilatory capacity of coronary resistance vessels in dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 1994;**127**:376-381.
5. Kiuchi K, Sato N, Shannon RP, Vatner DE, Morgan K, Vatner SF. Depressed beta-adrenergic receptor- and endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:1013-1023.
6. McGoldrick RB, Kingsbury M, Turner MA, Sheridan DJ, Hughes AD. Left ventricular hypertrophy induced by aortic banding impairs relaxation of isolated coronary arteries. *Clin Sci (Lond)* 2007;**113**:473-478.
7. Hubert F, Belacel-Ouari M, Manoury B, Zhai K, Domergue-Dupont V, Mateo P, Joubert F, Fischmeister R, Leblais V. Alteration of vascular reactivity in heart failure: Role of phosphodiesterases type 3 and 4. *Br J Pharmacol* 2014;**171**:5361-5375.
8. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 2014;**13**:290-314.
9. Komasa N, Lugnier C, Stoclet JC. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1991;**104**:495-503.
10. Polson JB, Strada SJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;**36**:403-427.
11. Kaneda T, Kubota T, Fujimoto K, Urakawa N, Nakajyo S, Shimizu K. Effects of rolipram on U46619-induced contraction and cyclic nucleotide content in the porcine coronary artery. *J Smooth Muscle Res* 2010;**46**:17-29.

12. Rump AF, Acar D, Klaus W. A quantitative comparison of functional and anti-ischaemic effects of the phosphodiesterase-inhibitors, amrinone, milrinone and levosimendan in rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol* 1994;**112**:757-762.
13. Lindgren S, Andersson KE. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on isolated coronary, lung and renal arteries from man and rat. *Acta Physiol Scand* 1991;**142**:77-82.
14. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 2012;**69**:247-266.
15. White RE, Kryman JP, El-Mowafy AM, Han G, Carrier GO. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;**86**:897-905.
16. Roberts OL, Kamishima T, Barrett-Jolley R, Quayle JM, Dart C. Exchange protein activated by cAMP (EPAC) induces vascular relaxation by activating Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat mesenteric artery. *J Physiol* 2013;**591**:5107-5123.
17. Stott JB, Barrese V, Greenwood IA. Kv7 channel activation underpins epac-dependent relaxations of rat arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;**36**:2404-2411.
18. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2012;**52**:323-329.
19. Wu RS, Marx SO. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: Alpha- and beta-subunits. *Kidney Int* 2010;**78**:963-974.
20. Hu XQ, Zhang L. Function and regulation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today* 2012;**17**:974-987.
21. Latorre R, Castillo K, Carrasquel-Ursulaez W, Sepulveda RV, Gonzalez-Nilo F, Gonzalez C, Alvarez O. Molecular determinants of BK channel functional diversity and functioning. *Physiol Rev* 2017;**97**:39-87.
22. 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**:633-637.
23. Price JM, Cabell JF, Hellermann A. Inhibition of cAMP mediated relaxation in rat coronary vessels by block of Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels. *Life Sci* 1996;**58**:2225-2232.
24. Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Lederer WJ, Nelson MT. Frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol* 1998;**274**:C1346-1355.
25. Wellman GC, Nathan DJ, Saundry CM, Perez G, Bonev AD, Penar PL, Tranmer BI, Nelson MT. Ca<sup>2+</sup> sparks and their function in human cerebral arteries. *Stroke* 2002;**33**:802-808.
26. Wan E, Kushner JS, Zakharov S, Nui XW, Chudasama N, Kelly C, Waase M, Doshi D, Liu G, Iwata S, Shiomi T, Katchman A, D'Armiento J, Homma S, Marx SO. Reduced vascular smooth muscle BK channel current underlies heart failure-induced vasoconstriction in mice. *FASEB J* 2013;**27**:1859-1867.
27. Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R, Veksler V. Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 2008;**586**:5181-5192.
28. Thompson WJ, Appleman MM. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 1971;**10**:311-316.
29. Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura Y, Hidaka H. Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:347-356.



30. Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW. In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* 2001;**118**:63-78.
31. Nyborg NC, Baandrup U, Mikkelsen EO, Mulvany MJ. Active, passive and myogenic characteristics of isolated rat intramural coronary resistance arteries. *Pflugers Arch* 1987;**410**:664-670.
32. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;**391**:85-100.
33. White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK<sub>Ca</sub> channels through a cgmp-dependent mechanism. *Circ Res* 1995;**77**:936-942.
34. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion buthus tamulus. *J Biol Chem* 1990;**265**:11083-11090.
35. Maurice DH, Crankshaw D, Haslam RJ. Synergistic actions of nitrovasodilators and isoprenaline on rat aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1991;**192**:235-242.
36. Bardou M, Goirand F, Bernard A, Guerard P, Gatinet M, Devillier P, Dumas JP, Morcillo EJ, Rochette L, Dumas M. Relaxant effects of selective phosphodiesterase inhibitors on U46619 precontracted human intralobar pulmonary arteries and role of potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;**40**:153-161.
37. Rieg AD, Rossaint R, Verjans E, Maihofer NA, Uhlig S, Martin C. Levosimendan relaxes pulmonary arteries and veins in precision-cut lung slices - the role of K-channels, cAMP and cGMP. *PLoS One* 2013;**8**:e66195.
38. Li H, Hong da H, Son YK, Na SH, Jung WK, Bae YM, Seo EY, Kim SJ, Choi IW, Park WS. Cilostazol induces vasodilation through the activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in aortic smooth muscle. *Vascul Pharmacol* 2015;**70**:15-22.
39. Liu G, Shi J, Yang L, Cao L, Park SM, Cui J, Marx SO. Assembly of a Ca<sup>2+</sup>-dependent BK channel signaling complex by binding to beta2 adrenergic receptor. *EMBO J* 2004;**23**:2196-2205.
40. Xin W, Li N, Cheng Q, Petkov GV. Bk channel-mediated relaxation of urinary bladder smooth muscle: A novel paradigm for phosphodiesterase type 4 regulation of bladder function. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;**349**:56-65.
41. Zhai K, Chang Y, Wei B, Liu Q, Leblais V, Fischmeister R, Ji G. Phosphodiesterase types 3 and 4 regulate the phasic contraction of neonatal rat bladder smooth myocytes via distinct mechanisms. *Cell Signal* 2014;**26**:1001-1010.
42. Kim N, Chung J, Kim E, Han J. Changes in the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the coronary artery during left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2003;**93**:541-547.

## Figure Legends

**Figure 1. BK<sub>Ca</sub> channel inhibition inhibited the relaxant effect of cAMP-PDE inhibitors in rat LADCA.** Selective PDE4 inhibitor (Ro, 10  $\mu$ mol/L), or PDE3 inhibitor (Cil, 1  $\mu$ mol/L), or both inhibitors were applied on LADCA rings contracted with U46619 (U46, 0.3-1  $\mu$ mol/L) in the presence of BK<sub>Ca</sub> channel inhibitor IBTX (0.1  $\mu$ mol/L) or relevant vehicle (Control). **A:** Examples of traces obtained in the absence (Control, left-hand side) or in the presence of IBTX (right-hand side). **B:** Scatter plot showing individual data points and mean relaxation  $\pm$  SEM, in percentage of initial contraction. (+): IBTX; (-): Control. N=8-10. \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001 (Mann and Whitney test).

**Figure 2. Ro together with Cil increased BK<sub>Ca</sub> single-channel activity in LADCA SMCs.** Both inhibitors had no significant effect on NP<sub>o</sub> when used alone. **A:** a, b, and c show 3 independent recordings at PP=40 mV, before (Control) and during simultaneous perfusion of Ro and Cil. **B:** Individual (grey) and mean  $\pm$  SEM (black) data of n=6-11 cells from N=5-7 rats. NP<sub>o</sub> is expressed relative to mean values of Control. \*: P<0.05 vs. Control (Wilcoxon signed-rank test).

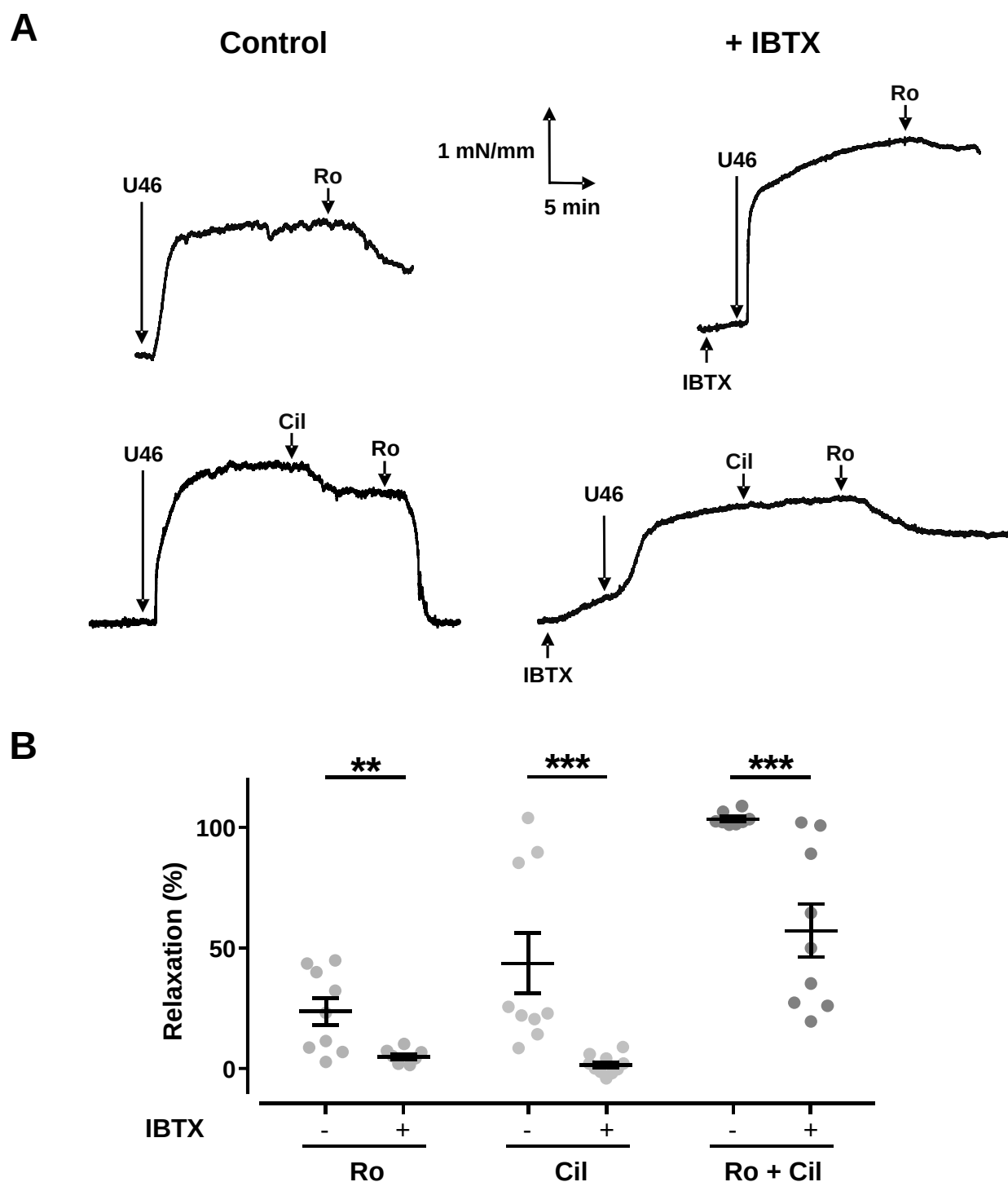
**Figure 3. Effect of PDE4 or PDE3 inhibition on concentration-response curves to isoprenaline or L-858051 in LADCA rings.** PDE4 (Ro: **A, B, E, F**) or PDE3 (Cil: **C, D, G, H**) inhibition was tested on concentration-response curves to isoprenaline (ISO, **A-D**) or L-858051 (L-85, **E-H**) in LADCA rings incubated with IBTX (right panels), or relevant vehicle (left panels). In the right panels (**B, D, F, H**), dashed line represents the concentration-response curve fit from control data. N=6-14. \*\*\*: P<0.001 (2-way ANOVA for repeated measures).

**Figure 4. BK<sub>Ca</sub> channel inhibition has no effect on the relaxant effect of PDE3/4 inhibitors in HF-LADCA.** PDE4 inhibitor (**A**, Ro), PDE3 inhibitor (**B**, Cil) or both inhibitors (**C**) were applied on contracted LADCA rings from sham and HF rats in the presence of IBTX (+) or vehicle (-). Scatter plot showing individual data points and mean relaxation  $\pm$  SEM, in percentage of initial contraction. N=4-7. \*: P<0.05, \*\*: P<0.01 (2-way ANOVA followed by Holm-Sidak test).

**Figure 5. Expression of BK<sub>Ca</sub> and PDE proteins in sham and HF rat LADCA.** Expression of BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -s.u. (**A**), PDE3A, PDE4A, PDE4B and PDE4D (**B**, from left to right, respectively) proteins in LADCA isolated from sham (empty circles in **C**) or HF (filled circles) rats. **A** (left panel) and **B** show representative immunoblot obtained for the proteins and matching GAPDH signal. Arrows indicate the bands that were quantified. **A** (right panel) and **C** show

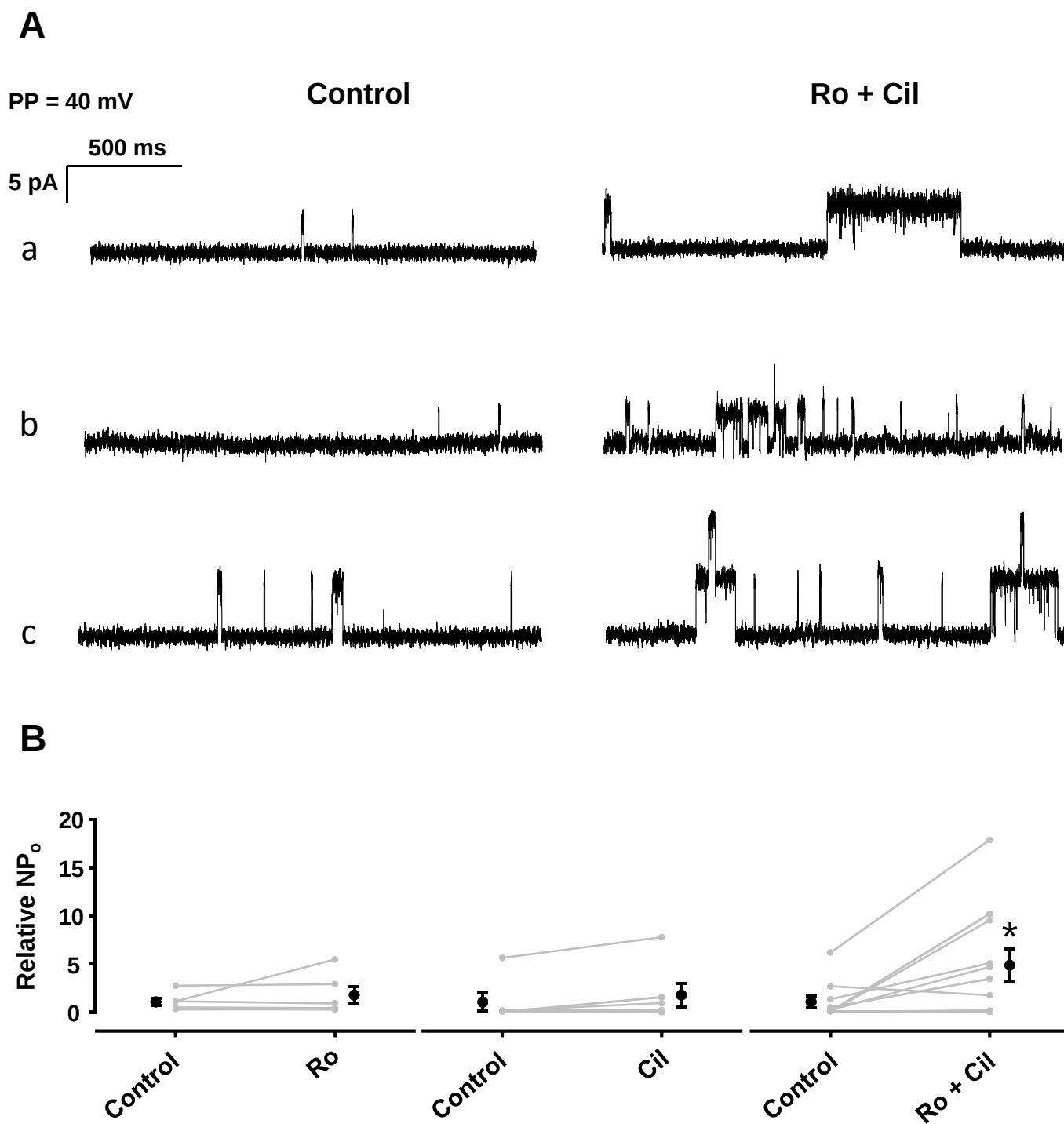
individual data and mean  $\pm$  SEM from quantification, normalized to GAPDH, relative to the mean expression level in sham group. N=5 for BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -s.u., PDE3A and PDE4B; and N=3 for PDE4A and PDE4D. \*\*: P<0.01 (Mann and Whitney test).

**Figure 6. Evidence for PDE3/4-BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -subunit duplexes.** PLA using an antibody against BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -subunit duplexed with anti-PDE3A (**A**), anti-PDE4 (pan specific, **B**) and anti-PDE4B antibodies (**C**) in sham- (images in upper panel, empty circles in scatter plot) or HF- (images in middle panel, filled circles) LADCA SMCs. Representative images are shown. Scale bar: 5  $\mu$ m. Inset show transmitted light image. Plots in lower panels show respective quantifications of PLA signal (individual data and mean  $\pm$  SEM) of n=12-84 cells from 2-3 rats. \*: P<0.05 (Mann and Whitney test).

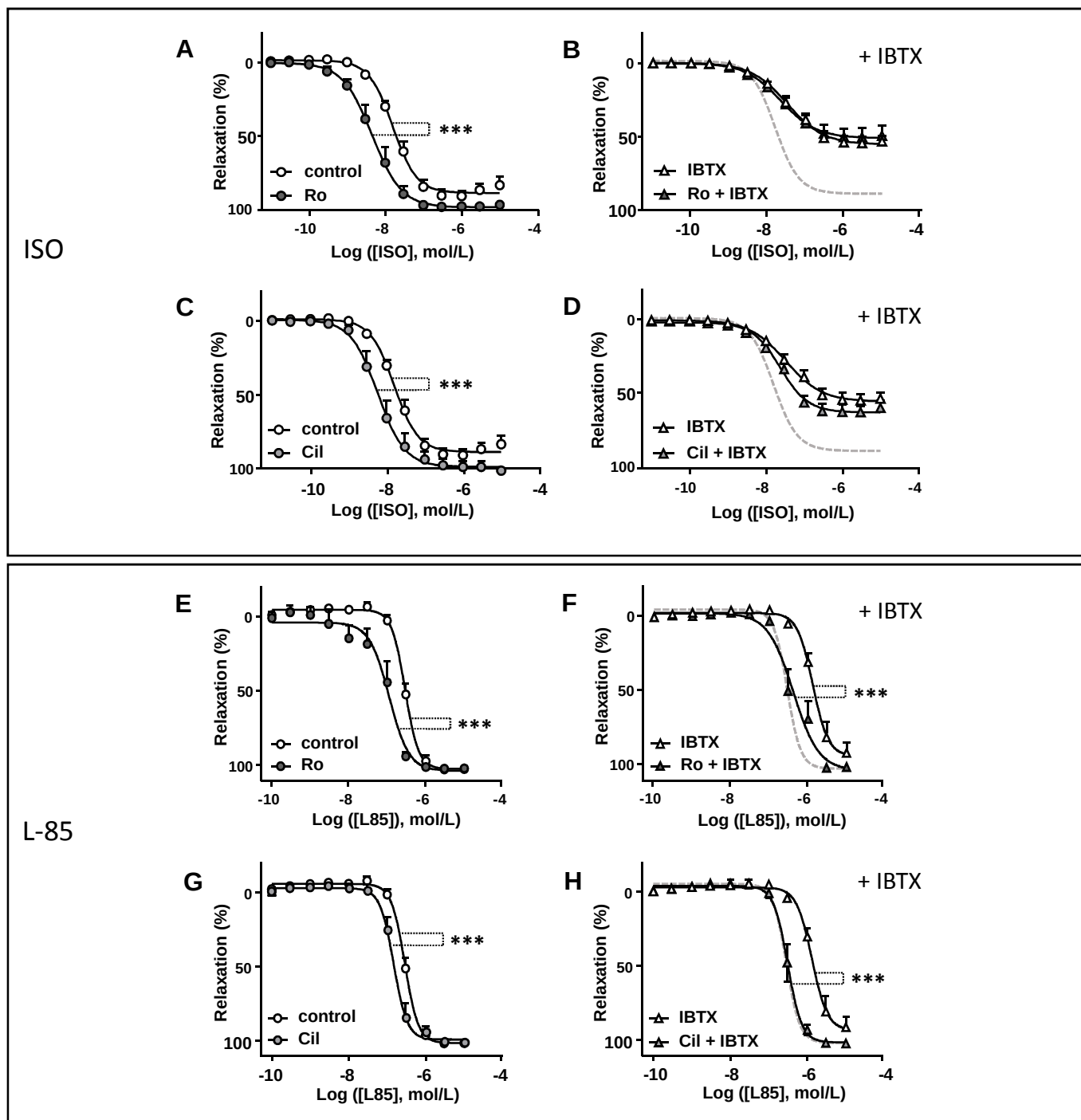


**Figure 1. BK<sub>Ca</sub> channel inhibition inhibited the relaxant effect of cAMP-PDE inhibitors in rat LADCA.** Selective PDE4 inhibitor (Ro, 10  $\mu$ mol/L), or PDE3 inhibitor (Cil, 1  $\mu$ mol/L), or both inhibitors (Ro + Cil) were applied on LADCA rings contracted with U46619 (U46, 0.3-1  $\mu$ mol/L) in the presence of BK<sub>Ca</sub> channel inhibitor IBTX (0.1  $\mu$ mol/L) or relevant vehicle (Control). **A:** Examples of traces obtained in the absence (Control, left-hand side) or in the presence of IBTX (right-hand side). **B:** Scatter plot showing individual data points and mean relaxation  $\pm$  SEM, in percentage of initial contraction. (+): IBTX; (-): Control. N=8-10. \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001 (Mann and Whitney test).

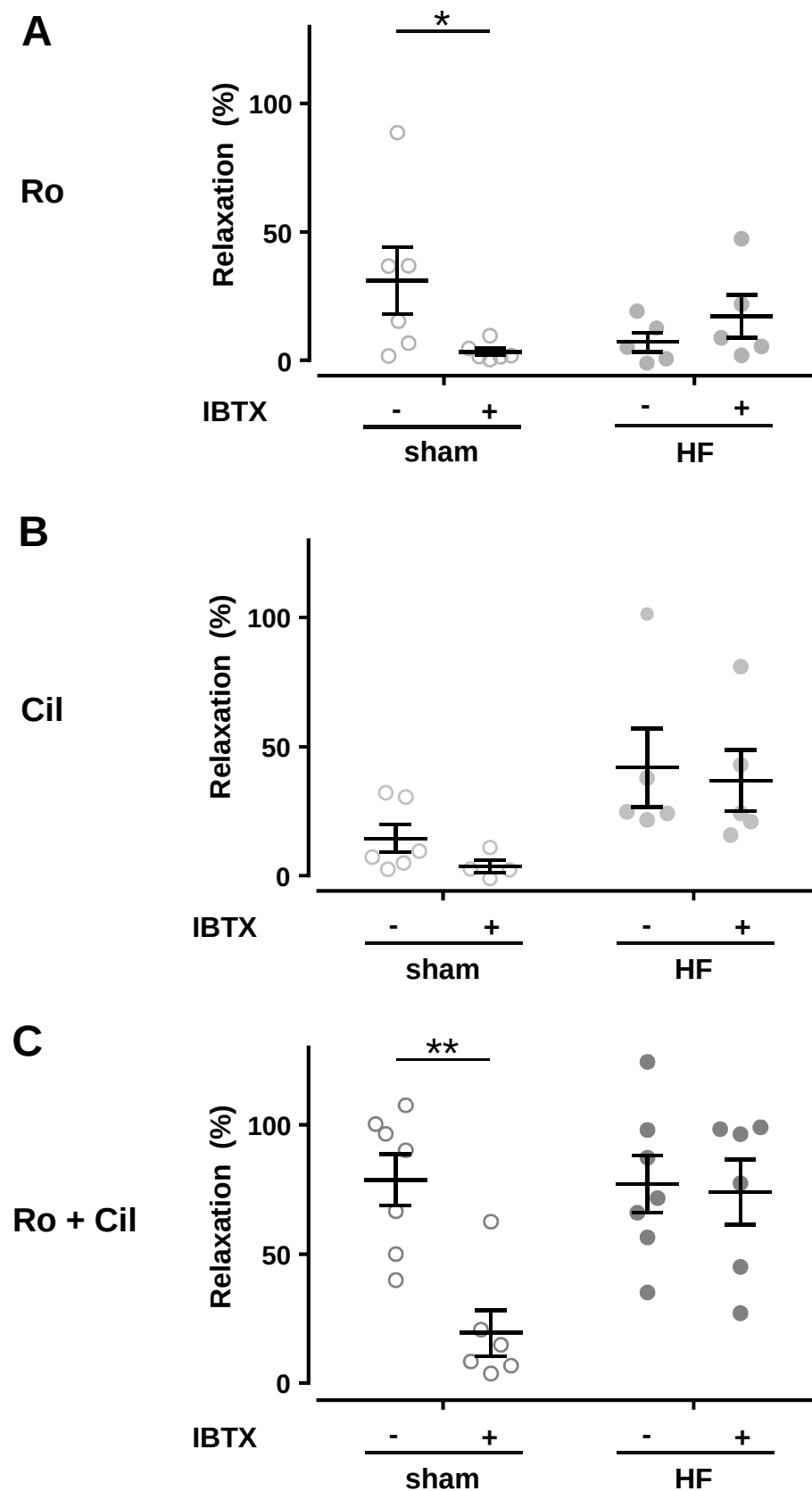
Figure 2



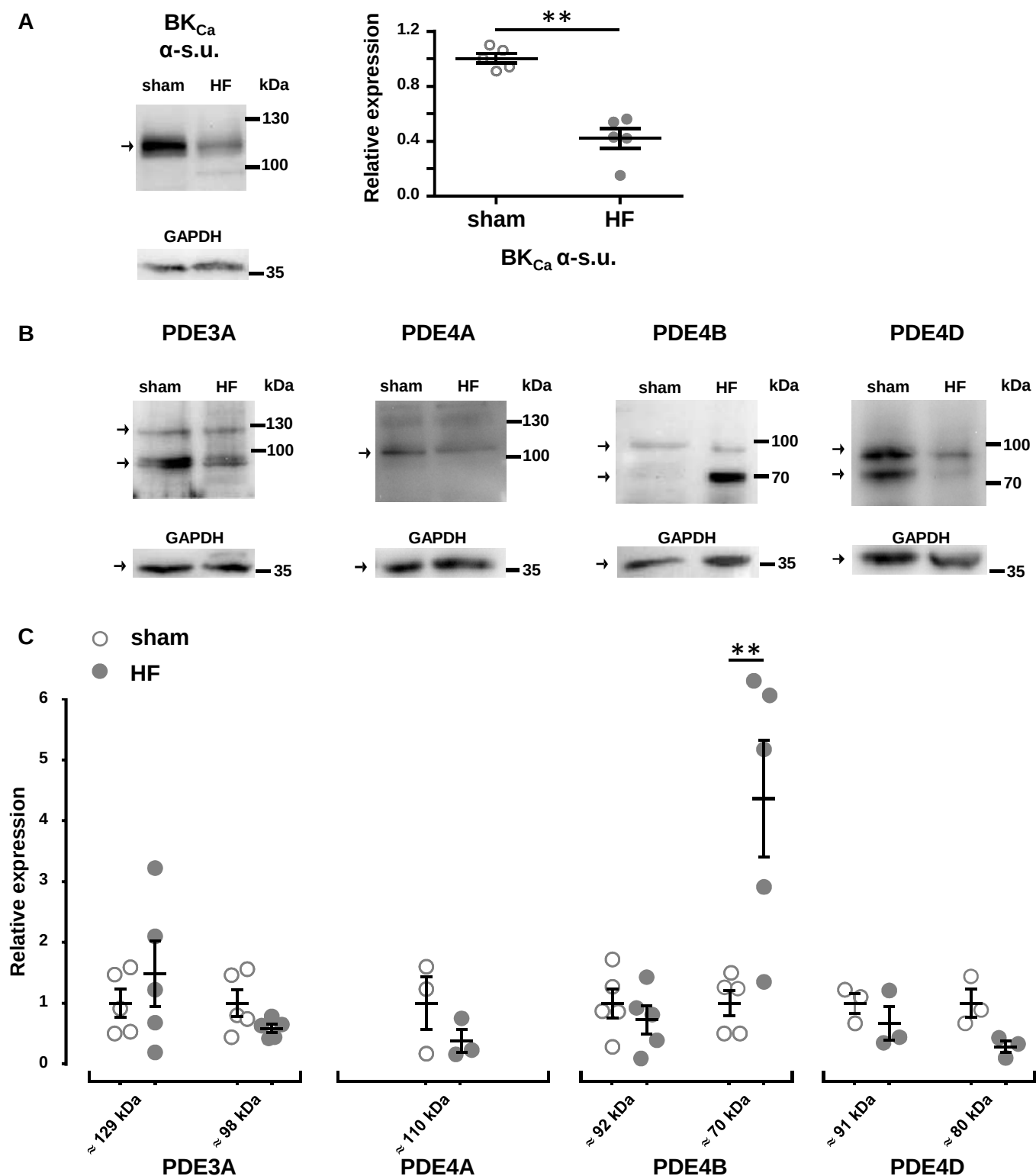
**Figure 2. Ro together with Cil increased BK<sub>Ca</sub> single-channel activity in LADCA SMCs.** Both inhibitors had no significant effect on NP<sub>o</sub> when used alone. **A:** a, b, and c show 3 independent recordings at PP=40 mV, before (Control) and during simultaneous perfusion of Ro and Cil. **B:** Individual (grey) and mean (black) data of n=6-11 cells from N=5-7 rats. NP<sub>o</sub> is expressed relative to mean values of Control. \*: P<0.05 vs. Control (Wilcoxon signed-rank test).



**Figure 3. Effect of PDE4 or PDE3 inhibition on concentration-response curves to isoprenaline or L-858051 in LADCA rings.** PDE4 (Ro: **A, B, E, F**) or PDE3 (Cil: **C, D, G, H**) inhibition was tested on concentration-response curves to isoprenaline (ISO, **A-D**) or L-858051 (L-85, **E-H**) in LADCA rings incubated with IBTX, in the right panels, or relevant vehicle, in the left panels. In the right panels (**B, D, F, H**), dashed line represents the concentration-response curve fit from control data. N=6-14. \*\*\*:  $P < 0.001$  (2-way ANOVA for repeated measures).

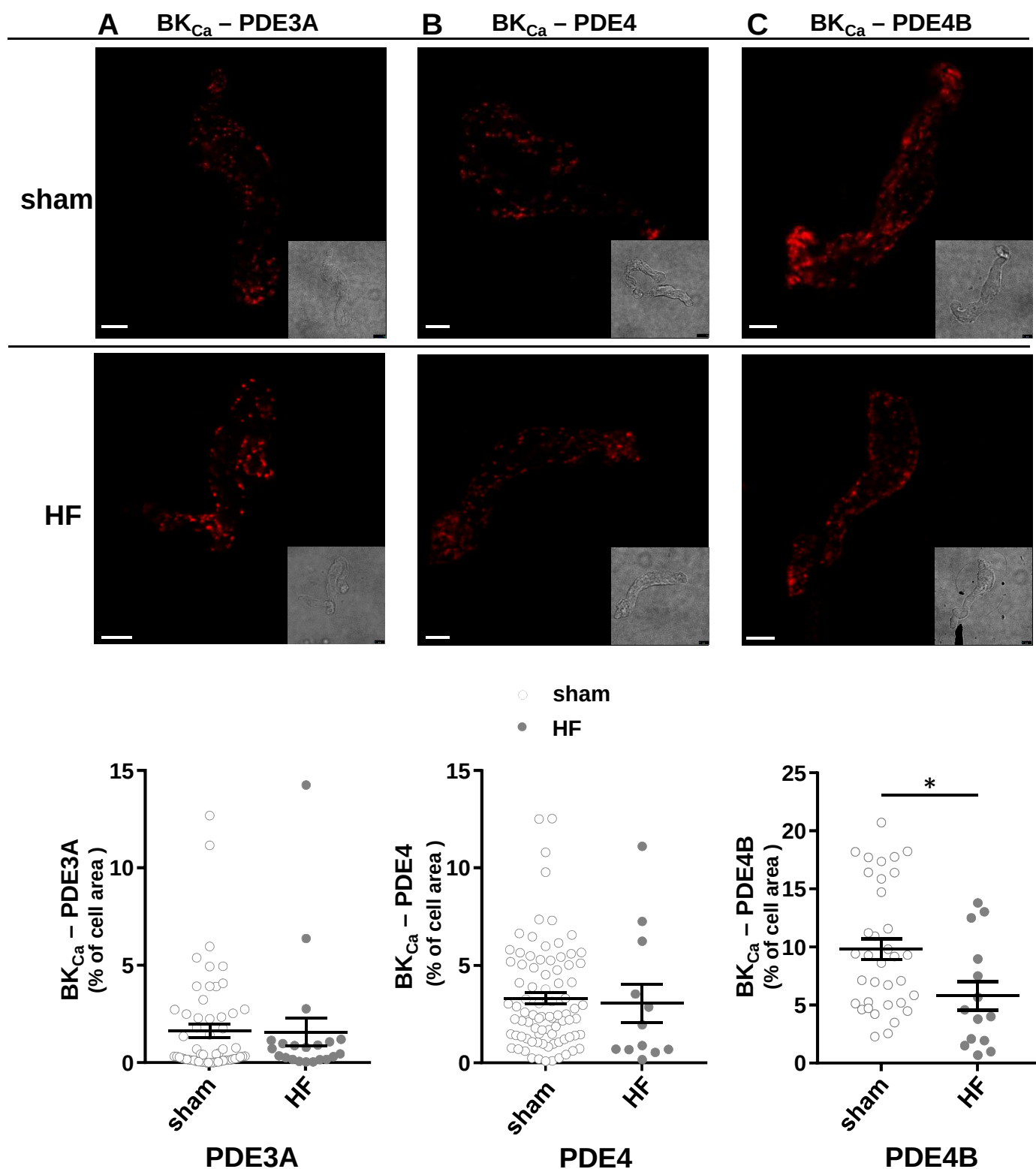


**Figure 4.  $BK_{Ca}$  channel inhibition has no effect on the relaxant effect of PDE3/4 inhibitors in HF-LADCA.** PDE4 inhibitor (**A**, Ro), PDE3 inhibitor (**B**, Cil) or both inhibitors (**C**) were applied on contracted LADCA rings from sham and HF rats in the presence of IBTX (+) or vehicle (-). Scatter plot showing individual data points and mean relaxation  $\pm$  SEM, in percentage of initial contraction. N=4-7. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (2-way ANOVA followed by Holm-Sidak test).



**Figure 5. Expression of BK<sub>Ca</sub> and PDE proteins in sham and HF rat LADCA.** Expression of BK<sub>Ca</sub> α-s.u. (A), PDE3A, PDE4A, PDE4B and PDE4D (B, from left to right, respectively) proteins in LADCA isolated from sham (empty circles in C) or HF (filled circles) rats. A (left panel) and B show representative immunoblot obtained for the proteins and matching GAPDH signal. Arrows indicate the bands that were quantified. A (right panel) and C show individual data and mean ± SEM from quantification, normalized to GAPDH, relative to the mean expression level in sham group. N=5 for BK<sub>Ca</sub> α-s.u., PDE3A and PDE4B; and N=3 for PDE4A and PDE4D. \*\*: P<0.01 (Mann and Whitney test).





**Figure 6. Evidence for PDE3/4- $BK_{Ca}$   $\alpha$ -subunit duplexes.** PLA using an antibody against  $BK_{Ca}$   $\alpha$ -subunit duplexed with anti-PDE3A (A), anti-PDE4 (pan specific, B) and anti-PDE4B antibodies (C) in sham- (images in upper panel, empty circles in scatter plot) or HF- (images in middle panel, filled circles) LADCA SMCs. Representative images are shown. Scale bar: 5  $\mu$ m. Inset show transmitted light image. Plots in lower panels show respective quantifications of PLA signal (individual data and mean  $\pm$  SEM) of n=12-84 cells from 2-3 rats. \*: P<0.05 (Mann and Whitney test).

## Detailed Material and Methods

### Animals and surgical procedures

All animal care and experimental procedures conformed to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament) and authorizations to perform animal experiments according to application decrees were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (No. D-92-283, 13 December 2012). A total of 164 rats were used in the experiments described here. This included 8-12-week-old, male Wistar rats that were used for basic physiological exploration. In addition, 21 rats with HF sacrificed 22 weeks after surgical stenosis of the ascending aorta were used. The surgical procedure was carried out on 3-week-old rats, under anaesthesia with a ketamine-xylazine mix (75 mg/kg – 10 mg/kg, respectively, 0.3 mL/100g, i.p.). Aortic stenosis was mimicked by placing a stainless steel hemoclip (0.6 mm-internal diameter) on the ascending aorta via thoracic incision, as previously described<sup>1</sup>. Also, 21 age-matched control animals underwent the same procedure without placement of the clip. Buprenorphine chlorhydrate (0.2 mL/100g, s.c.) was administered twice daily for 3 days beginning at the end of the surgery.

### Materials

Cilostamide (Cil) was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK) and Ro-20-1724 (Ro) from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK). 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), acetylcholine (ACh), isoprenaline (ISO) phentolamine, trypsin inhibitor (T6522), bovine serum albumin, dithiothreitol (DTT) and snake venom from *Crotalus atrox* were supplied by Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). Iberiotoxin (IBTX), a selective blocker of BK<sub>Ca</sub> channels<sup>2</sup>, was bought from Latoxan (Valence, France) or Smartox Biotechnologie (Saint Martin d'Hères, France), ryanodine from Alomone (Jerusalem, Israel), U46619 from Interchim (Montluçon, France) and L-858051 (L-85) from Enzo Life Science (Villeurbanne, France). Ro, Cil, and ryanodine were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Final concentration of DMSO usually did not exceed 0.03%, except for experiments using royanodine where maximal DMSO amounted to 0.33%. ISO was prepared in ascorbic acid (1%). Other pharmacological agents were dissolved in water. For each given experiment, amounts of vehicle (water or DMSO) were matched in all groups studied. The following enzymes were used for tissue digestion: papain (Sigma Aldrich, P4762), collagenase H (Roche, 1074032 or Sigma Aldrich, C7926). All salts for solutions were from Sigma-Aldrich or Euromedex (Souffelweyersheim, France)

### **Coronary artery isolation and smooth muscle cells preparation**

Rats were anesthetized by injection of pentobarbital (150 mg/kg, i.p.). The heart was quickly isolated and placed in an ice-cold “Krebs” solution of following composition (in mmol/L): NaCl 119, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  2.5,  $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2, glucose 11,  $\text{NaHCO}_3$  25, bubbled with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  to maintain pH at 7.4. The heart was then pinned in a Sylgard®-coated dish filled with Krebs solution and the ventricle was carefully dissected to isolate the left anterior descending coronary artery (LADCA, inner diameter 100–300  $\mu\text{m}$ ). Dissecting solution was renewed every 10-15 min with cold, bubbled solution. Collected tissue was then frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ , or freshly processed, according to the following relevant protocols.

For isometric tension measurements, LADCA was cut into small segments of (0.5-2 mm length and mounted on a wire myograph (see relevant section below).

Isolated smooth muscle cells were obtained as described previously<sup>3</sup>, with some minor modifications. Briefly, LADCA was placed into ice-cold dissociation medium (DM) composed of (in mmol/L): NaCl 110, KCl 5, Hepes 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{NaHCO}_3$  0.5, taurine 10, EDTA 0.5, Glucose 10,  $\text{CaCl}_2$  0.2,  $\text{MgCl}_2$  2,  $\text{pH}\approx 7$ . Then tissue was incubated in papain 1.5 mg/mL in DM for 1 h, then during 6 min at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of DTT (1 mg/mL) under gentle agitation. LADCA was then transferred in DM mixture containing collagenase (1.6 mg/mL) and trypsin inhibitor (1.6 mg/mL) and further incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 4 min. Tissue was then washed 3 times with ice-cold DM and gently triturated using a blunt Pasteur pipette to obtain relaxed, spindle-shaped SMCs. Undigested tissue was discarded, cells were centrifugated (200 g,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min), re-suspended in  $\approx 0.5$  mL DM and kept on ice. For patch-clamp experiments, a similar protocol was used except that only 13 min papain digestion step was performed in DTT and bovine serum albumin (1 mg/mL). Cells were used within 7 h following digestion.

### **cAMP-PDE activity assay**

cAMP-PDE activity was measured by a two-step radioenzymatic assay according to the method reported by Thompson and Appleman<sup>4</sup>. Frozen LADCA were homogenized in lysis buffer containing Hepes 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, NP-40 0.5% and microcystin 1  $\mu\text{mol/L}$ . During the first step, protein extracts (10  $\mu\text{g}$ ) were incubated in a mix containing 10 mmol/L Tris-HCl ( $\text{pH}=8$ ), 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 5 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol, 1  $\mu\text{mol/L}$  cAMP (Sigma Aldrich), and  $10^5$  cpm of [ $^3\text{H}$ ]-cAMP (PerkinElmer) for 25 min at  $33^\circ\text{C}$ . The reaction was performed in a final volume of 200  $\mu\text{L}$  and allowed the cAMP hydrolysis by PDEs into 5'-adenosine monophosphate. The reaction was stopped by addition of 200  $\mu\text{L}$  of “stop” solution (Tris-HCl 40 mmol/L, EDTA 10 mmol/L,  $\text{pH}=8$ ) and boiling during 1 min. In the

second step, an excess of 5'-nucleotidase (snake venom from *Crotalus atrox*, 1 mg/mL) was incubated with samples (20 min, 33°C) to convert 5' adenosine monophosphate into adenosine. The enzymatic reaction products were separated by anion-exchange chromatography using 1 mL of AG1-X8 resin (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and quantified by scintillation counter. Reactions were carried out with or without inhibitors of PDEs, namely 100  $\mu\text{mol/L}$  IBMX, as a non-selective PDE inhibitor, 1  $\mu\text{mol/L}$  Cil, as a selective PDE3 inhibitor<sup>5</sup> and 10  $\mu\text{mol/L}$  Ro, as a selective PDE4 inhibitor<sup>6</sup>. IBMX-sensitive PDE activity, PDE3 and PDE4 activities were defined as the fraction of total activity that was sensitive to corresponding inhibitor.

### **Vascular reactivity measurement**

Each small segment of LADCA was mounted in the chamber of a small vessel myograph (620 M, Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) using 25  $\mu\text{m}$  tungsten wire, as previously described<sup>7</sup>. Chambers were filled with Krebs solution, bubbled with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> mixture and warmed at 37°C. Data were digitized using a Powerlab 8/30 (AD Instruments, Paris, France) and acquired using the Labchart7 software (AD Instruments). Vessels underwent a normalization procedure which consisted in stretching the vessels stepwise to construct tension-circumference relationship. Rings were eventually set at an internal circumference corresponding to 90% of the circumference the vessel would have if submitted to a transmural pressure of 100 mmHg (13.3 kPa). After an equilibration period of 45-60 min, contractile capacity of the vessels was evaluated by challenging them with a modified Krebs solution containing 80 mmol/L KCl with equimolar substitution of NaCl. This depolarizing solution (K80) normally evoked robust contraction, and was left for 5 min. Then chambers were washed with a "Ca<sup>2+</sup>-free" modified-Krebs solution, containing no Ca<sup>2+</sup> and supplemented with 0.1 mmol/L EGTA (Sigma-Aldrich), until the vessel was fully relaxed and tension was stabilized. This allowed to suppress possible constitutive tone that would otherwise mask the minimum tension level. Then, normal Krebs solution was added for 5 min, "Ca<sup>2+</sup>-free" modified-Krebs solution was subsequently added for 3 min and K80 challenge was repeated. After an additional series of washes, the vessels were bathed in Krebs and used for various pharmacological protocols: (i) Endothelial function was evaluated in all vessels by measurement of the relaxant effect induced by 1  $\mu\text{mol/L}$  ACh following contraction of the vessels with the thromboxane A<sub>2</sub> mimetic U46619 (0.3-1  $\mu\text{mol/L}$ ), to reach  $\approx 100\%$  of the amplitude obtained with the second K80 challenge. In experiments involving young adult rats, vessels contracting less than 1 mN/mm to challenge with K80, or relaxing less than 50% to ACh were excluded. (ii) In experiments set out to study the vasorelaxant effect of PDE3 inhibition, the rings were contracted with U46619. Once stabilized contraction was obtained, 1  $\mu\text{mol/L}$  Cil (a concentration selective for PDE3 inhibition<sup>5</sup>) was added. To

study additional effect of PDE4 inhibition, PDE4 inhibitor Ro (10  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>6</sup> was added on top of Cil. In other vessels, Ro was applied first and Cil was then added on the top. Data mentioned as “Cil + Ro” represented pooled data obtained using both sequences of compound addition. When addressing the role of ion channels in the relaxant effect of PDE inhibitors, inhibitors or relevant vehicle were applied during 15 min before contracting the vessels. (iii) In other experiments, vasorelaxant agonists (ACh, ISO, L-85) were added on U46619-contracted vessels in a stepwise, cumulative fashion to establish concentration-response curve (CRC). ISO was added in the presence of the  $\alpha$ -adrenergic receptor antagonist phentolamine ( $10^{-5}$  M). Again, when relevant, Cil, Ro or IBTX were added at least 15 min before contraction. Contractile responses were expressed in mN/mm and relaxant responses were expressed in %, relative to the contraction amplitude obtained with U46619. Tension level at the end of the last “Ca<sup>2+</sup>-free” challenge was considered to be the minimal tension from which amplitude of the response was calculated.

### Patch clamp

Single channel recording was performed in freshly isolated LADCA myocytes, using either cell-attached or inside-out configurations of the patch clamp technique<sup>8</sup>. Patch pipette, made from glass capillaries (Vitrex Medical A/S, Herlev, Denmark) pulled using a DMZ-universal puller (Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried, Germany), had resistance of 2-5 MOhm. Cells suspended in  $\approx 50$   $\mu\text{L}$  DM were allowed to settle 5-10 min on the bottom of a Petri dish and then gently covered by  $\approx 3$  mL of extracellular bath solution<sup>9</sup> (in mmol/L: KCl 140, MgCl<sub>2</sub> 10, CaCl<sub>2</sub> 0.1, Hepes 10, D-glucose 30, pH=7.2). High K<sup>+</sup> concentration in the bath was used to bring cell membrane potential close to 0 mV and therefore to better control the patch membrane potential. Experiments were conducted at room temperature (20-23°C).

For cell-attached recordings, pipette solution<sup>9</sup> contained (in mmol/L): KCl 5, NaCl 110, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, Hepes 10, pH=7.4 adjusted with NaOH. In some experiments, 0.1  $\mu\text{mol/L}$  IBTX was added in the pipette solution. Generation of voltage commands and current acquisition were performed with Clampex (PCLamp 10, Molecular Devices Inc.) through a Digidata 1440A and an Axopatch 200B amplifier (Axon CNS, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). A gigaseal was obtained and current was recorded at patch potential (PP) of 40 mV (where PP= - applied voltage, due to the inverted output polarity in this configuration). Current was digitized at 10 kHz, filtered at 5 kHz (low pass Bessel filter). Different combinations of PDE inhibitors diluted in the bath solution were directly perfused over the cell using multiple pipes fused to a single manifold outlet. Perfusion with PDE inhibitor was started after the vehicle (DMSO 0.03%) had been perfused for 2-5 min and channel activity was stable. For analysis, traces were further low-pass filtered offline at 2 kHz. Single channel

activity was analyzed using the single channel detection tool of Clampfit (PCLamp 10, Molecular Devices Inc.) which gave average channel open state activity ( $NP_o$ , number of channels  $\times$  open probability) and mean unitary current level amplitude. Analysis was performed over a 0.5 to 5 min period of continuous recording during stable channel activity.

For inside-out recordings, the following pipette solution was used (in mmol/L): KCl 140,  $MgCl_2$  1,  $CaCl_2$  0.1, Hepes 10, pH=7.4 adjusted with KOH, allowing to work in symmetrical  $K^+$  condition. Several PP were tested, each during 15-30 s, to build up the current-PP relationship of the conductance detected.

### **Western Blot analysis**

Frozen LADCA were homogenized in ice-cold "Rippa" buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH=8), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail™, Sigma-Aldrich). Tissues were homogenized with a Precellys®24 (Bertin instrument, Montigny-Le-Bretonneux, France) for 10 s and kept in ice for few minutes. Supernatant was collected following centrifugation at 12000  $g$ , 4°C for 5 min. Before electrophoresis, samples were prepared in fresh mix of Laemmli buffer and  $\beta$ -mercaptoethanol. Samples were generally heated at 95°C during 5 min except for  $BK_{Ca}$  detection where samples were kept on ice. Similar amounts of protein samples (50  $\mu$ g) extracted from sham and HF rat LADCA were subjected to SDS-PAGE (8%) and electrotransferred onto PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France). Membranes were then blocked with 5% non-fat dry milk dissolved in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TTBS) for 1 h for PDE detection or 2 h for  $BK_{Ca}$   $\alpha$ -subunit detection. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: a rabbit polyclonal antibody anti-PDE3A (1/10000; kind gift from Dr. Chen Yan, University of Rochester Medical Center, NY, USA), anti-PDE4A (1/5000), a rabbit polyclonal anti-PDE4B (1/1000), and anti-PDE4D (1/1000), kind gifts from Dr. Marco Conti (University of California, San Francisco, CA, USA), a mouse monoclonal antibody anti- $BK_{Ca}$   $\alpha$ -subunit (1/500; #75-022, purchased from University of California Davis/NIH NeuroMab Facility), and anti-GAPDH (1/4000; #2118, Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA). After washing 3 times with TTBS, the membranes were incubated 1 h at room temperature with either horse anti-mouse IgG-HRP (1/3000; #7076, Cell Signalling) or goat anti-rabbit IgG-HRP (1/10000; #sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA). Detection was performed with chemiluminescence reagent (Pierce ECL Western blotting substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For quantification, tiff images were analyzed with ImageJ 1.50b software. Signals were submitted to densitometric analysis and GAPDH was used for

normalization. Results were expressed relatively to the mean expression level in sham group.

### **Proximity ligation assay (PLA)**

Freshly isolated LADCA SMCs from HF and sham rats were seeded on glass coverslips and fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) prepared in phosphate buffered saline (PBS) for 10 min at room temperature. Following 3 washes with PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 0.2% BSA for 10 min at room temperature. Then, coverslips were incubated in a quenching solution (50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  prepared in PBS) aiming at minimizing autofluorescence and washed 5 min in PBS. PLA protocol was carried out according to the recommendation of manufacturer (Duolink® PLA, Sigma-Aldrich). Primary antibodies were used at the indicated dilutions: anti-BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -subunit (1/300), anti-PDE3A (1/400), anti-PDE4B (1/100), or a pan-PDE4 (rabbit polyclonal, 1/100; #PD4-101AP, FabGennix, Frisco, TX, USA). Preparations were incubated with anti-BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -subunit antibody and one type of anti-PDE antibody (100  $\mu\text{L}$ ) overnight at 4°C. Preparations incubated with only one antibody were used as negative control. After washing, incubation of relevant secondary antibodies, ligation, and amplification were performed. After the final wash with appropriated buffer, the slides were washed with purified water and mounted in "Mowiol" medium (Mowiol® 4.88 g, glycerol 6 g, TrisHCl 0.2 mol/L; all compounds from Sigma-Aldrich) on glass slides. PLA images were acquired with a laser scanning confocal microscope (SP5, Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) equipped with an x60 water immersion objective. The presence of PLA probes was revealed by excitation with a white light laser at 554 nm and emission was collected at 579 nm, using similar parameters for all slides testing a given antibody association. Because preliminary experiments using PDE4B and BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -subunit antibodies led to saturating PLA signal (high fluorescence level and coalescence of the puncta), polymerization time for this specific condition was reduced to 90 min (rather than 100 min) to dampen the signal. Tiff images were created and analyzed using the ImageJ 1.50b software. All single cell images corresponding to one given couple of antibodies were converted into 8-bit and binarized using a common threshold value. Threshold value was set arbitrarily to clearly discriminate fluorescence puncta from background. Results were expressed as the percentage of cell area covered by PLA signal. This technique allows to detect co-localization of proteins in a 40 nm range.

### **Data and statistical analysis**

CRCs obtained for each vessel were fitted with the Hill equation using Prism 7 software (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA) and pharmacological parameters, namely  $\text{pD}_2$  and maximal effect ( $E_{\text{max}}$ ), were obtained.  $\text{pD}_2$  was defined as the negative logarithm of  $\text{EC}_{50}$ ,

giving the concentration of drug required to promote half maximal response. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. N represented the number of rats while n represented the number of cells in electrophysiology and PLA experiments. Where relevant, 2-group comparisons were performed using non-parametric Mann and Whitney test, with the following exceptions: paired comparisons were performed using the Wilcoxon signed-rank paired test to analyze the effect of addition of PDE inhibitors on the single channel activity vs. Control in the same cell. In comparisons involving more than 2 treatments, 1-way ANOVA followed by Holm-Sidak multiple comparison post-test was used. When comparing the effect of IBTX in sham and HF animals, 2-way ANOVA was used. Comparison of CRCs was performed using 2-way ANOVA for repeated measures. Values of  $P < 0.05$  were considered for statistical significance.

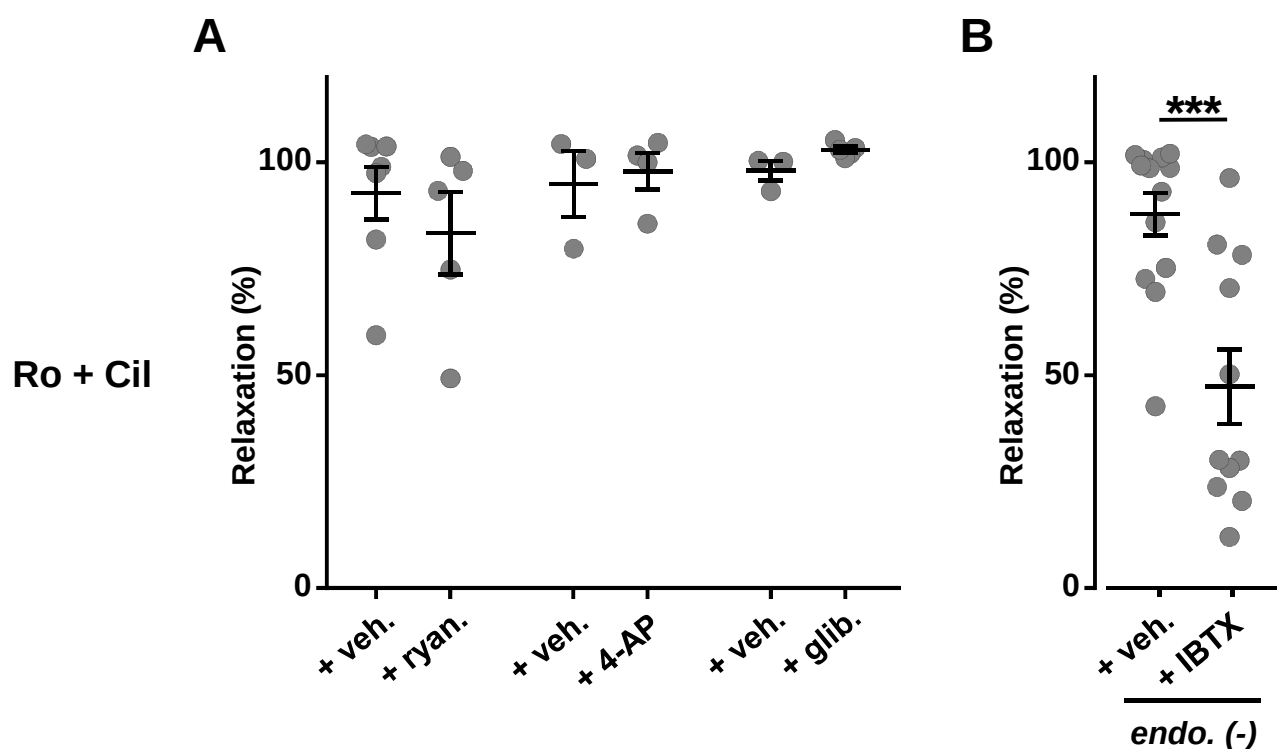
### Supplemental References

1. Joubert F, Wilding JR, Fortin D, Domergue-Dupont V, Novotova M, Ventura-Clapier R, Veksler V. Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin atpase is differently impaired in rats with heart failure. *J Physiol* 2008;**586**:5181-5192.
2. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion buthus tamulus. *J Biol Chem* 1990;**265**:11083-11090.
3. Gautier M, Hyvelin JM, de Crescenzo V, Eder V, Bonnet P. Heterogeneous Kv1 function and expression in coronary myocytes from right and left ventricles in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**292**:H475-482.
4. Thompson WJ, Appleman MM. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry* 1971;**10**:311-316.
5. Sudo T, Tachibana K, Toga K, Tochizawa S, Inoue Y, Kimura Y, Hidaka H. Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:347-356.
6. Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J, Karpen JW. In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* 2001;**118**:63-78.
7. Nyborg NC, Baandrup U, Mikkelsen EO, Mulvany MJ. Active, passive and myogenic characteristics of isolated rat intramural coronary resistance arteries. *Pflugers Arch* 1987;**410**:664-670.
8. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;**391**:85-100.
9. White RE, Darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK<sub>Ca</sub> channels through a cgmp-dependent mechanism. *Circ Res* 1995;**77**:936-942.

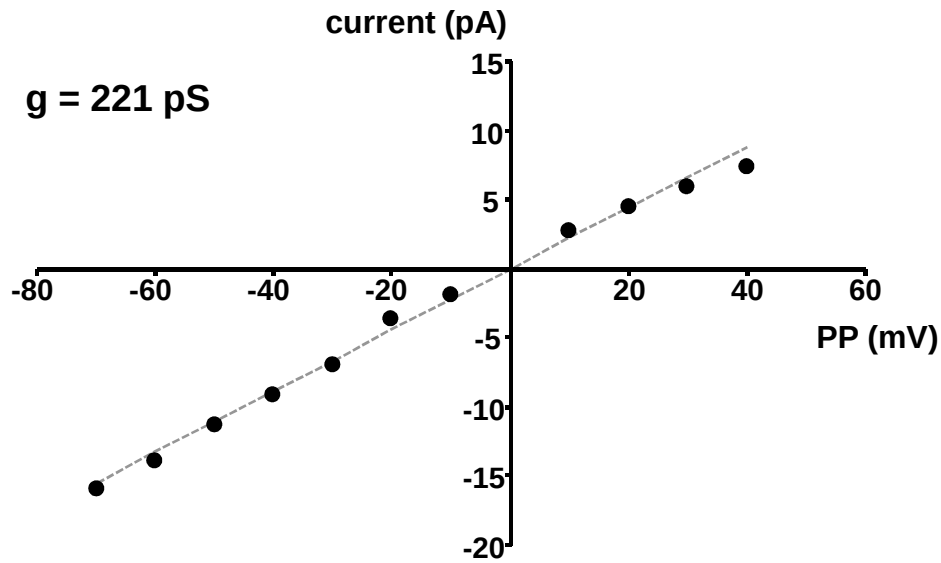
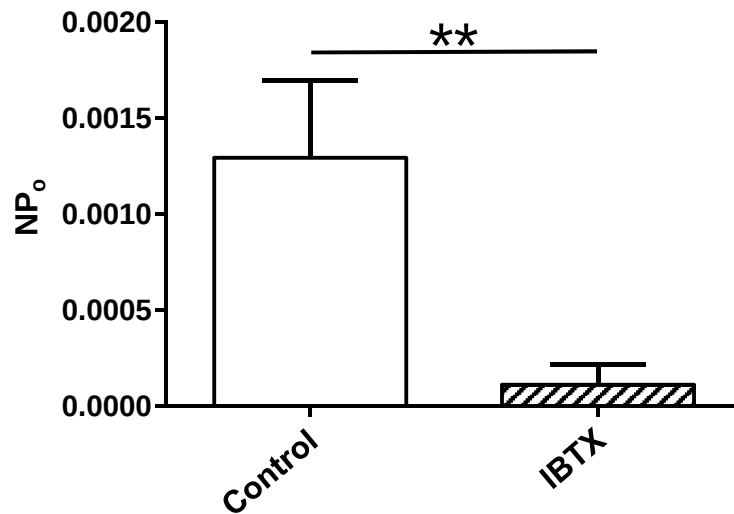


## Supplemental Figures

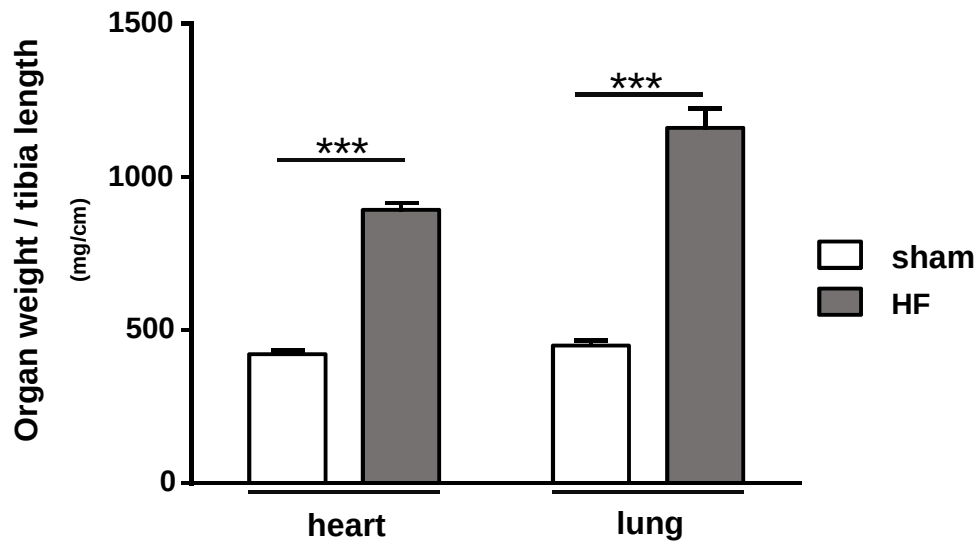
(contains Suppl. Figures I to V)



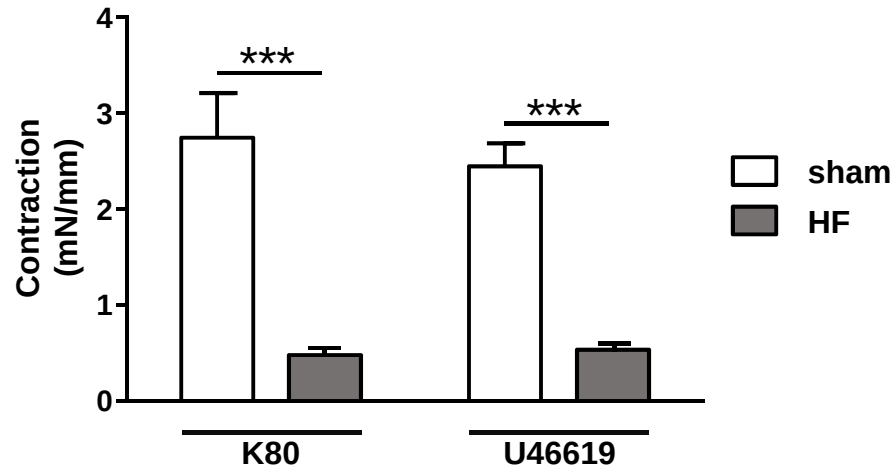
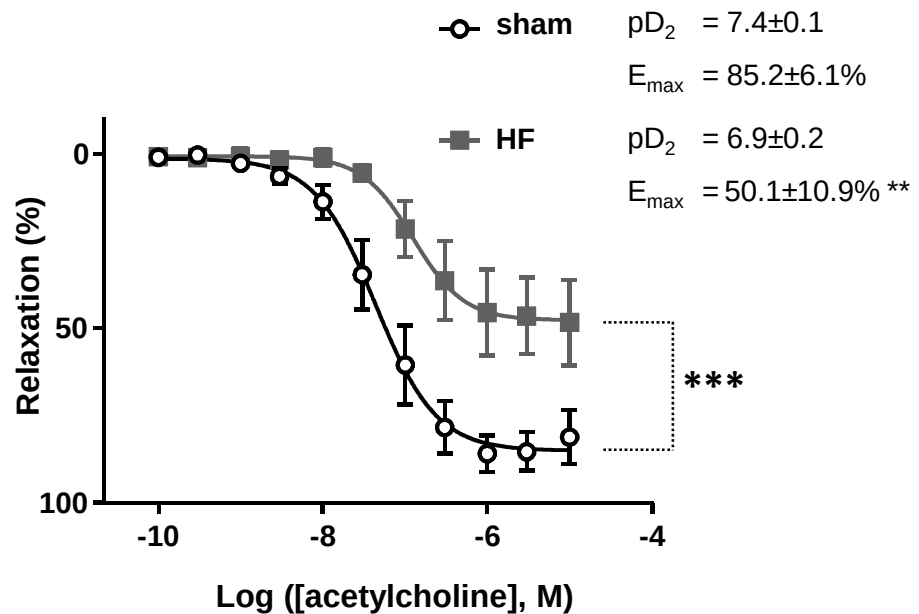
**Supplemental Figure I. A. Relaxant effect of combined application of Ro and Cil is not altered by ryanodine (“ryan.”, 30  $\mu$ mol/L), 4-amino-pyridine (“4-AP”, 1 mM), or glibenclamide (“glib”, 10  $\mu$ M). B. Relaxant effect by Ro + Cil was still inhibited by IBTX in rings after the endothelium was voluntarily damaged (“endo (-)”). Both selective PDE4 inhibitor, Ro-20-1724 (Ro, 10  $\mu$ mol/L) and PDE3 inhibitor, cilostamide (Cil, 1  $\mu$ mol/L) were applied on LDCA rings contracted with U46619 in the presence of various ion channel inhibitors or relevant vehicle (“veh.”). Data are individual data and means  $\pm$  SEM. N=3-13. \*\*\*:  $P \leq 0.001$  (Mann and Whitney test).**

**A****B**

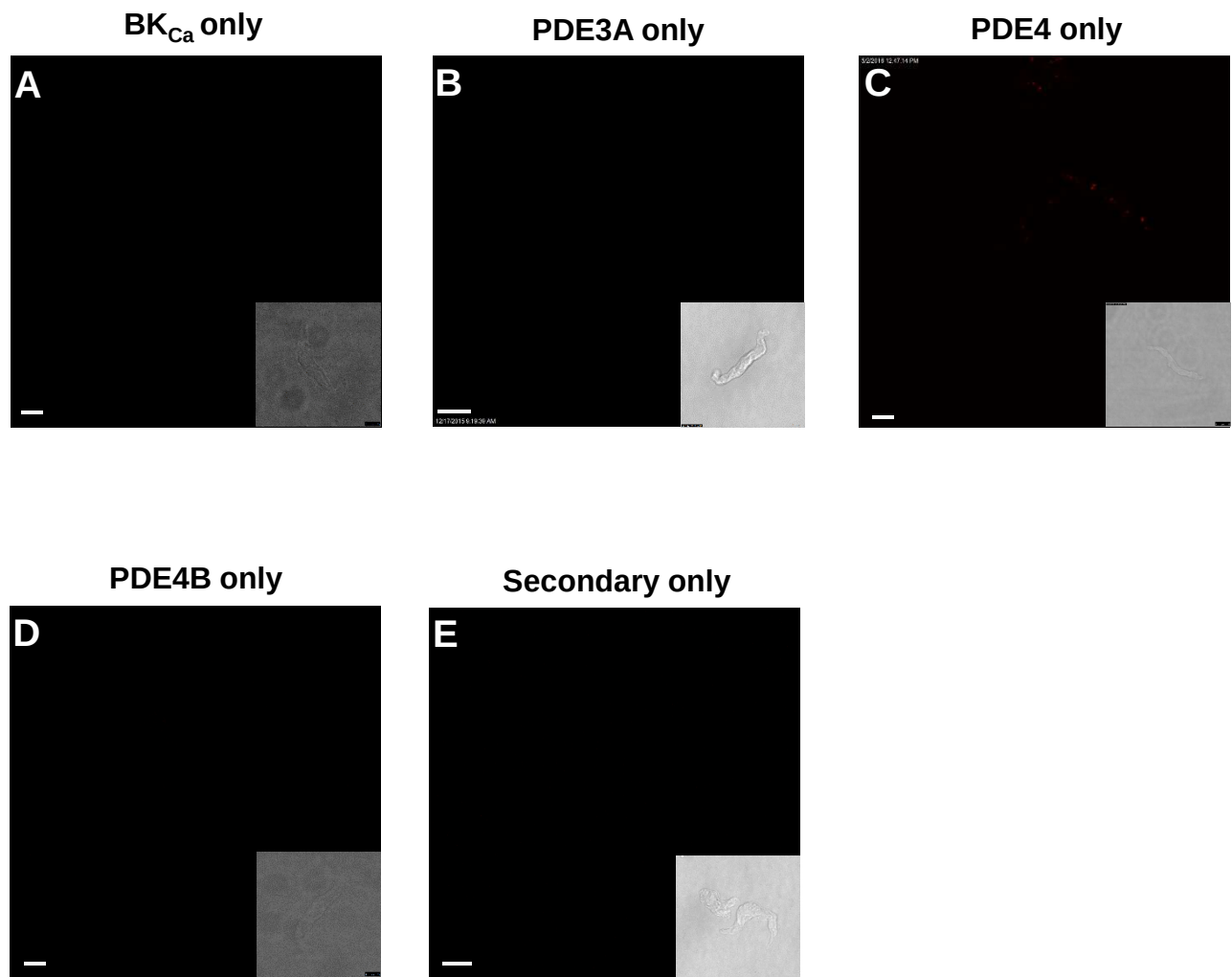
**Supplemental Figure II. Characterization of  $BK_{Ca}$  single channel activity in rat LDCA SMCs.** **A.** Using inside-out patches in symmetrical  $[K^+]$  and high  $Ca^{2+}$  ( $[K^+] = 140 \text{ mmol/L}$ ,  $[Ca^{2+}] = 0.1 \text{ mmol/L}$ ), a unitary conductance ( $g$ ) of 221 pS was measured (average of 2 patches). **B.** Using cell-attached patches under physiological  $[K^+]$  gradient ( $[K^+]$  in pipette = 5 mmol/L), specific  $BK_{Ca}$  inhibitor IBTX (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) abolished single channel activity (*i.e.* opening probability at any level,  $NP_o$ ) when present in the pipette solution. Patch potential (PP) = 40 mV.  $n = 6-9$  cells from  $N = 2$  rats. \*\*:  $P < 0.01$  (Mann and Whitney test).



**Supplemental Figure III. Rats with aortic stenosis display cardiac hypertrophy and lung edema.** The ratio of heart or lung weight over tibia length obtained from rats in sham and HF groups is shown. Data are means  $\pm$  SEM. N=16-17. \*\*\*:  $P < 0.001$  (Mann and Whitney test).

**A****B**

**Supplemental Figure IV. LDCA from HF rats displayed altered vasoreactivity. A.** Contractile response induced by addition of high  $K^+$  solution (K80) or U46619 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) on LDCA isolated from rat with HF (filled bars) or control sham animals (blank bars). **B.** Relaxant response to cumulative concentrations of acetylcholine in LDCA isolated from HF or sham rats and contracted with U46619 (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Data are mean  $\pm$  SEM. N=7. \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , vs. sham (A, Mann and Whitney test ; B: 2-way ANOVA for repeated measures).

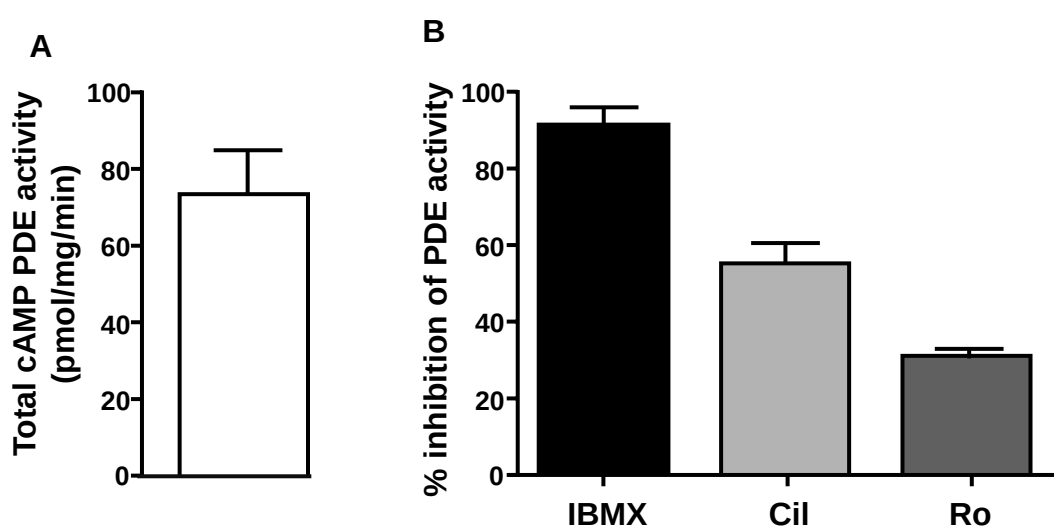


**Supplemental Figure V.** Negative control experiments of *in situ* PLA using the following primary antibodies: anti-BK<sub>Ca</sub>  $\alpha$ -subunit alone (**A**), anti-PDE3A alone (**B**), anti-PDE4 alone (**C**), an anti-PDE4B alone (**D**), or relevant pair of Duolink® oligonucleotide-associated secondary antibodies (**E**), in young rat LDCA SMCs. **A**, **B**, **C**, **D** and **E** are representative confocal images. Scale bar: 5  $\mu$ m. Insets show transmitted light images.

## 2.2. Présentation synthétique des résultats supplémentaires

### 2.2.1. Caractérisation du profil d'activité d'hydrolyse de l'AMPc dans l'artère artères coronaires de rat

Des études précédentes réalisées dans plusieurs lits vasculaires ont rapporté que les PDE3 et PDE4 étaient les deux principales familles hydrolysant l'AMPc (Hubert et al., 2014; revue par Polson and Strada, 1996). C'est pourquoi, nous avons vérifié cette hypothèse dans notre modèle d'étude, l'artère coronaire gauche de rat (ACG). L'activité totale mesurée est de  $76 \pm 11$  pmol/min/mg (Figure supplémentaire 1 ci-dessous). La contribution des familles de PDE3 et PDE4 a été évaluée par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs. L'activité de la PDE3, mesurée en présence de cilostamide (Cil, 1  $\mu$ M) est majoritaire, équivalente à  $55 \pm 5\%$  de l'activité totale. L'activité de la PDE4, mesurée en présence Ro-20-1724 (Ro, 10  $\mu$ M) est équivalente à  $33 \pm 2\%$  de l'activité totale. L'utilisation d'un inhibiteur non sélectif, l'IBMX (100  $\mu$ M) diminue l'activité totale de  $91 \pm 3\%$ . Nous constatons que l'activité cumulée des PDE3 et PDE4 représente environ 83% de l'activité totale, ceci suggère que ces deux familles de PDE sont les principales à hydrolyser l'AMPc dans l'ACG.



**Figure supplémentaire 1 : Activité PDE-AMPc dans les artères coronaires gauches de rat.**

L'activité PDE-AMPc a été mesurée en présence de 1  $\mu$ M [ $^3$ H]-AMPc dans les lysats d'artères coronaires gauches. Le profil d'activité des PDE-AMPc a été déterminé en absence (activité totale) ou en présence de l'inhibiteur non sélectif des PDE, IBMX (100  $\mu$ M) ou d'un inhibiteur sélectif d'une famille de PDE (PDE3 : Cil à 1  $\mu$ M; PDE4 : Ro à 10  $\mu$ M). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM du % d'inhibition de l'activité totale. N = 4-6 expériences indépendantes réalisées sur des tissus récupérés de 13-23 rats.

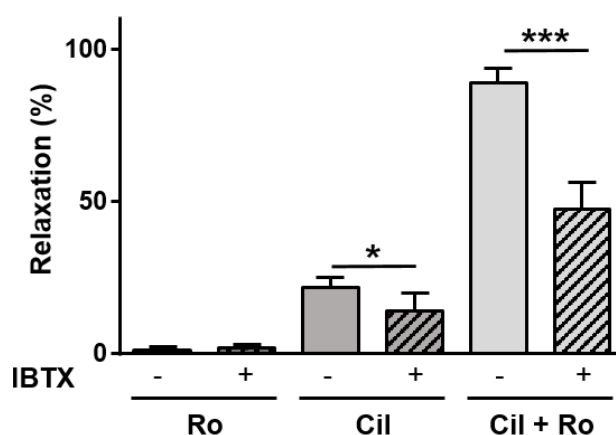
### 2.2.2. Rôle des BK<sub>Ca</sub> dans la réponse relaxante induite par l'inhibition de la PDE3 et PDE4 dans l'artère coronaire gauche

Les résultats présentés dans la figure 1 de l'article indiquent que l'effet relaxant de l'inhibiteur de PDE3 et de PDE4 est dépendant est aboli lorsque les canaux BK<sub>Ca</sub> sont inhibés par l'IBTX.

#### - Etude du rôle de l'endothélium dans cette voie de signalisation

Comme de nombreuses voies endothéliales régulent le tonus vasculaire, nous avons évalué l'impact de l'élimination de l'endothélium sur l'effet relaxant des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 ainsi que la conséquence sur le rôle des BK<sub>Ca</sub> (Figure supplémentaire 2 ci-dessous). Nos résultats indiquent que le Ro n'a pas eu d'effet relaxant sur les artères pré-contractées alors que le Cil a induit une réponse vasorelaxante. Cette dernière est inhibée en présence d'IBTX, inhibiteur des BK<sub>Ca</sub>. De plus, l'inhibition concomitante de la PDE3 et de la PDE4 induit une relaxation complète des artères pré-contractées, diminuée de moitié lorsque les BK<sub>Ca</sub> sont inhibés.

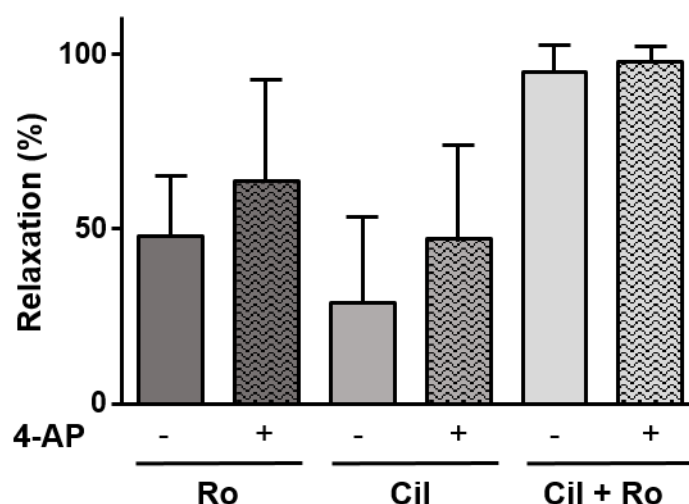
Ces résultats indiquent que même si l'absence d'endothélium altère la réponse relaxante au Ro, elle n'altère pas l'importance des BK<sub>Ca</sub> dans la réponse relaxante induite par l'inhibition du Cil seul ou en présence de Ro. Ceci suggère que le rôle des BK<sub>Ca</sub> est indépendant de l'endothélium.



**Figure supplémentaire 2 : Effet de l'inhibition des BK<sub>Ca</sub> sur la réponse relaxante des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 dans les segments d'ACG de rat dépourvus d'endothélium fonctionnel.** L'inhibiteur de PDE3, cilostamide (Cil, 1  $\mu$ M) et l'inhibiteur de PDE4 Ro-20-1724 (Ro, 10  $\mu$ M) ont été appliqués séparément ou simultanément sur des segments d'ACG pré-contractés à l'U46619, en présence d'ibériotoxine (+, IBTX, 100 nM) ou de son véhicule (-). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM (N = 4-6). \* : P < 0,05 ; \*\*\* < 0,001.

## - Etude du rôle des $K_v$ et des $K_{ATP}$ dans l'effet relaxant de l'inhibiteur de PDE3 et PDE4

Afin d'évaluer la contribution spécifique des  $BK_{Ca}$  dans la réponse relaxante aux inhibiteurs de PDE3 et PDE4, nous avons réalisé d'autres expériences de réactivité vasculaire en incubant les segments d'ACG avec un inhibiteur des  $K_v$ , la 4-aminopyridine (4-AP, 1 mM) ou un inhibiteur des  $K_{ATP}$ , le glibenclamide (Glib, 10  $\mu$ M). La 4-AP ne semble pas altérer les réponses relaxantes au Cil et Ro, utilisées séparément ou de façon simultanée (Figure supplémentaire 3 ci-dessous).



**Figure supplémentaire 3 : Effet de l'inhibition des  $K_v$  sur la réponse relaxante des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 dans les segments d'ACG de rat.** L'inhibiteur de PDE3, cilostamide (Cil, 1  $\mu$ M) et l'inhibiteur de PDE4 Ro-20-1724 (Ro, 10  $\mu$ M) ont été appliqués séparément ou simultanément sur des segments d'ACG pré-contractés à l'U46619, en présence de 4-AP (+, 100 nM) ou de son véhicule (-). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM (N = 3-4).

Même si les expériences réalisées en présence de Glib sont préliminaires (N = 2-5), il ne semble pas y avoir d'altération des réponses relaxante au Ro et au Cil ou au deux inhibiteurs simultanément (résultats non présentés).

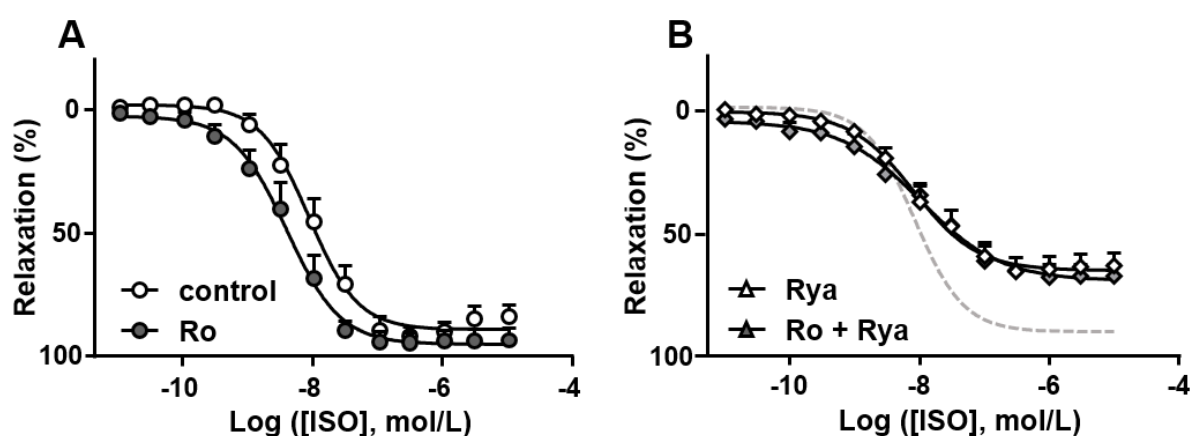


### 2.2.3. Rôle des BK<sub>Ca</sub> dans l'effet potentialisateur des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 sur la réponse β-adrénergique

Après avoir évalué le rôle des BK<sub>Ca</sub> dans la réponse relaxante du Cil et du Ro en condition de production basale d'AMPC (Figure 1), nous avons examiné leur rôle en situation de production stimulée d'AMPC (Figure 3). Nos résultats indiquent que l'inhibition des BK<sub>Ca</sub> abolit l'effet potentialisateur du Ro et du Cil sur la réponse à l'ISO mais pas sur le L-85.

Comme l'activité des BK<sub>Ca</sub> peut être modulée par les *sparks* calciques (Nelson et al., 1995), nous avons examiné leur implication dans la réponse β-drénergique (Figure supplémentaire 4 ci-dessous).

Les résultats indiquent que l'inhibition des *sparks* calciques par la ryanodine (Rya, 30 μM) diminue de façon significative l'efficacité de l'ISO ( $E_{\max}$  contrôle :  $83,31 \pm 3,70\%$  ;  $E_{\max}$  Rya :  $64,70 \pm 5,3\%$ , \*\*\* :  $P < 0,001$ ) et abroge l'effet potentialisateur du Ro (Figure 10). Ces effets seront prochainement étudiés sur l'effet potentialisateur du Cil.



**Figure supplémentaire 4 : Effet de l'inhibition de PDE4 sur la réponse relaxante induite par des concentrations cumulatives d'isoprénaline en présence de ryanodine (Rya) ou de son véhicule (control) sur des segments d'ACG.** Les courbes concentration-effet à l'isoprénaline (ISO) ( $10^{-10}$  M –  $10^{-5}$  M) sont réalisées sur des segments d'ACG incubés avec l'inhibiteur de PDE4 Ro-20-1724 (Ro, 10 μM, A) seul ou en présence de ryanodine (Rya, 30 μM, B) ou de leur véhicule respectif. Les pointillés en gris sur la figure B représente la courbe en condition contrôle. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de N = 8-11.

### **3. Conclusion**

Ce travail avait pour but d'étudier l'implication des canaux BK<sub>Ca</sub> dans la régulation du tonus de l'artère coronaire de rat par les PDE3 et de PDE4 d'abord en condition de production basale d'AMPc, puis en condition de production stimulée. Après avoir caractérisé cette voie de signalisation sur le plan physiologique, nous l'avons étudiée en situation pathologique, dans un modèle d'IC induite par surcharge de pression chez le rat. Les principaux résultats sont les suivants :

- Lors de cette étude, nous avons mis en évidence l'existence d'un signalosome impliquant la PDE3/PDE4 et les canaux BK<sub>Ca</sub> dans un périmètre n'excédant pas les 40 nm, indiqué par la technique de PLA (Proximity Ligation Assay). Cette colocalisation faciliterait la régulation de l'activité des BK<sub>Ca</sub> par ces PDEs que nous avons confirmée par les données de patch-clamp.
- De plus nous avons constaté une implication différentielle des canaux BK<sub>Ca</sub> dans la réponse relaxante induite par l'inhibition de la PDE3 et PDE4. En effet, lorsque l'AMPc est produit de façon constitutive, les BK<sub>Ca</sub> constituent d'importants effecteurs de cette réponse relaxante. Résultat observé même lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Cependant lorsque l'AMPc est produit par activation des adénylates cyclases, le rôle des BK<sub>Ca</sub> est moindre car l'effet potentialisateur des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 sur la réponse au L85 reste conservé même en présence du bloqueur des BK<sub>Ca</sub>, l'IBTX.
- Nous avons constaté que l'inhibition des RyR n'altérerait pas la réponse relaxante des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 en condition basale, alors qu'il semble important pour l'effet potentialisateur de l'inhibition de la PDE4 sur la réponse  $\beta$ -adrénergique.
- De manière intéressante, la contribution du couplage fonctionnel entre le canal BK<sub>Ca</sub> et les PDE3 et PDE4 n'a pas été retrouvée dans les artères coronaires isolées de rats IC. Ceci pourrait être expliqué par une diminution de l'expression des canaux BK<sub>Ca</sub> ainsi que, au moins partiellement, par une raréfaction de leur localisation à proximité de la PDE4B.

Ces résultats indiquent l'existence d'une régulation spécifique des canaux BK<sub>Ca</sub> par les PDE3 et PDE4 dans les artères coronaires. La contribution de ces canaux semble être différente en fonction de la quantité d'AMPc produite. Il serait donc intéressant d'évaluer les concentrations d'AMPc produites en condition basale et stimulée. La proximité des BK<sub>Ca</sub> avec les PDE3/4 semble faciliter cette régulation qui disparaît lors de l'IC possiblement à cause de la diminution de l'expression des BK<sub>Ca</sub> à l'échelle protéique. La réponse relaxante aux inhibiteurs de PDE3

et PDE4 est préservée et semble impliquer d'autres effecteurs moléculaires que les  $BK_{Ca}$ ,  
possiblement d'autres canaux potassiques ( $K_v$ ,  $K_{ATP}$ ).

# **Projet II : Rôle des PDEs-AMPC dans la régulation du tonus vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque : Étude d'un modèle de vaisseau résistif, l'artère mésentérique**

## **1. Introduction**

L'IC est définie comme une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur conduisant à un apport en oxygène insuffisant pour répondre aux besoins métaboliques des différents organes. C'est un syndrome complexe qui regroupe divers mécanisme physiopathologique (Ponikowski et al., 2016).

A l'échelle de la cellule cardiaque, l'exposition prolongée aux catécholamines circulantes est responsable d'altération de la signalisation de l'AMPC qui aggrave la pathologie. Il est classiquement décrit une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques associée à la diminution de leur expression (Bristow, 1993; Bristow et al., 1986, 2010; Maurice et al., 1999). Une diminution de l'expression des PDEs, avec pour conséquence une altération du contrôle spatiotemporel de la réponse AMPC (Ding et al., 2005; Lehnart et al., 2005) parfois même à un stade précoce d'hypertrophie (Abi-Gerges et al., 2009; Yanaka et al., 2003).

Des anomalies plus spécifiques du lit vasculaire ont été décrites avec un déséquilibre dans la libération des facteurs endothéliaux en faveur des facteurs contractants (Harrison et al., 2006b). Cette dysfonction endothéliale caractérisée par la diminution de la biodisponibilité du NO est responsable en partie de l'augmentation des résistances vasculaire (Harrison et al., 2006b). D'autre étude ont rapporté une altération des réponses vasorelaxantes aux agents élévateurs de la [AMPC], activant la voie spécifique des récepteurs  $\beta$ -adrénergique où le signal serait plus confiné, mais aussi la voie des adénylates cyclases, où le signal AMPC serait plus diffus dans la cellule (Mathew et al., 1993; McGoldrick et al., 2007; Nasa et al., 1996).

Récemment, notre équipe a exploré l'expression et les altérations fonctionnelles des PDEs de l'aorte dans un modèle d'IC chronique développée après sténose chirurgicale de l'aorte ascendante (Hubert et al., 2014). Cette étude a mis en évidence une activité globale PDE-AMPC inchangée avec la prédominance des familles PDE3 et PDE4. L'expression de certaines isoformes est modifiée lors de l'IC, où l'on observe une expression accrue de l'isoforme PDE3A et PDE4B. Au niveau du contrôle du tonus vasculaire, il apparaît que, alors que les PDE3 et PDE4 semblent toutes deux limiter la vasorelaxation chez les rats « SHAM » (contrôles), c'est la contribution de la PDE3 qui prédomine dans les aortes de rats IC.

En effet, il a été constaté que lors de l'IC, l'effet vasorelaxant de l'inhibition de la PDE4, ainsi que de la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique sont presque abolis. Cependant, l'inhibition de la PDE3 permet de restaurer ces réponses. L'exacerbation de la contribution de la PDE3 dans le contrôle du tonus vasculaire pourrait être expliqué par la dépression de la signalisation du GMPc qui pourrait être associée à la dysfonction endothéliale observée dans les aortes de rats IC. En effet, ce résultat est conforme aux observations précédentes démontrant l'influence inhibitrice de la voie NO endothélial-GMPc sur l'activité de la PDE3 vasculaire.

Dans la continuité de ce projet qui a évalué le rôle des PDEs-AMPc dans un modèle d'artère de conductance, l'aorte thoracique, et caractérisé les altérations fonctionnelles et biochimiques rencontrées lors de l'IC, notre projet était de renouveler cette étude, cette fois dans un modèle de vaisseaux résistif, l'artère mésentérique. De manière intéressante, des résultats préliminaires obtenus antérieurement à mon arrivée dans l'équipe ont permis mettre en évidence une implication possible de la PDE2 dans la régulation de certaines réponses contractiles de l'artère mésentérique, à la fois sur les tissus d'animaux IC et SHAM. Cette contribution de la PDE2 n'avait pas été observée dans les expériences sur l'aorte, ce qui pourrait suggérer un rôle spécifique de cette enzyme dans les artères de résistance.

Afin de poursuivre cette étude, j'avais pour mission l'exploration de l'influence de cette famille de PDE dans plusieurs types de réponses relaxante, sur le modèle d'anneaux artériels isolés. J'ai aussi réalisé des expériences de dosage d'activité PDE ainsi que des expériences Western blot afin de préciser le niveau d'expression de la PDE2 dans ces vaisseaux.

## **2. Résultats**

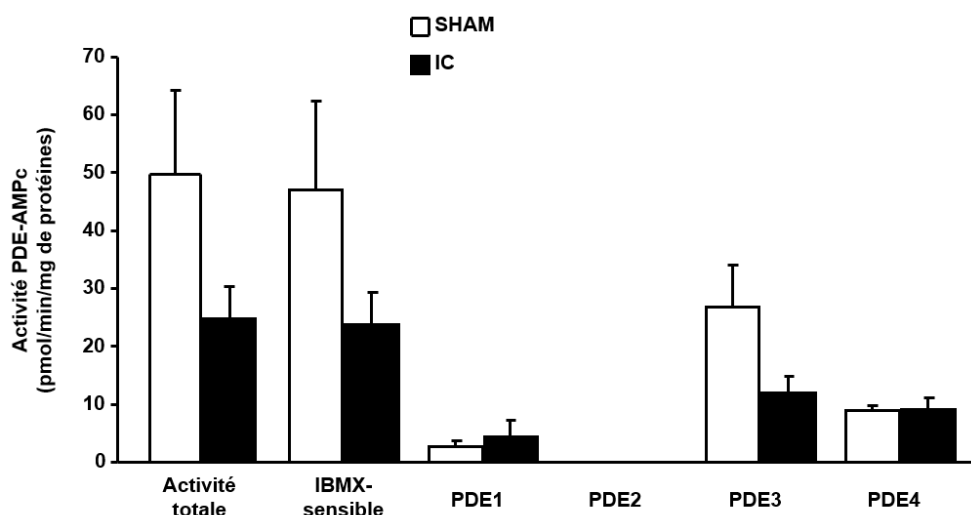
### **2.1. Mesure de l'activité PDE-AMPc dans les artères mésentériques de rats SHAM et IC**

Le dosage de l'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs a été réalisé à partir des artères mésentériques de rats SHAM et IC par dosage radioenzymatique, dans les mêmes conditions utilisées que lors de l'étude de l'aorte (Hubert et al., 2014).

Dans ce tissu, l'activité totale PDE-AMPc dans les artères mésentériques semble être diminuée de moitié chez les rats IC par rapport aux rats SHAM (Figure 1R). La contribution des familles de PDE 1, PDE2, PDE3 et PDE4 a été évaluée par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs. Dans les artères mésentériques de rats SHAM, l'activité PDE1, MIMX (10  $\mu$ M) est faible et ne représente que 7% de l'activité PDE-AMPc totale, alors qu'aucune activité sensible au BAY-60-7550 (BAY, 100 nM), un inhibiteur sélectif de la PDE2 n'a été détectée. Les inhibiteurs

sélectifs de la PDE3 et de la PDE4, respectivement le cilostamide (Cil, 1  $\mu$ M) et le Ro-20-1724 (Ro, 10  $\mu$ M) ont révélé des activités respectivement à 56% et 21% de l'activité totale. En résumé, l'ordre de classement des familles de PDE contribuant à l'activité globale d'hydrolyse de l'AMPc dans les artères mésentériques de rats SHAM est : PDE3 > PDE4 > PDE1. Dans les artères mésentériques isolées de rats IC, les activités PDE1, PDE3 et PDE4 représentent, respectivement, 18%, 48% et 37% de l'activité PDE-AMPc totale, alors que l'activité PDE2 n'a pas été détectée. Ainsi, le profil d'activité PDE-AMPc dans l'artère mésentérique des rats IC est le suivant : PDE3  $\approx$  PDE4 > PDE1. Comparativement aux artères isolées de rats SHAM, il semblerait que l'activité PDE3 soit réduite de moitié chez les rats IC, mais cette diminution est non significative.

J'ai par la suite entrepris des dosages en optimisant les conditions du dosage afin d'améliorer la détection de la PDE2. Notamment, la PDE2 étant activée par le GMPc, certains dosages ont été réalisés en présence de 5  $\mu$ M de GMPc. De plus, l'affinité de la PDE2 pour l'AMPc étant faible ( $K_m$  30-50  $\mu$ M), des expériences ont été conduites en utilisant plusieurs concentrations d'AMPc (10  $\mu$ M et 100  $\mu$ M), au lieu de 1  $\mu$ M utilisé pour le protocole standard. Afin d'augmenter la sensibilité du dosage, une quantité plus importante (70  $\mu$ g) d'extrait protéique a été utilisée dans certains essais. Ces essais de mise au point n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une activité significative sensible au Bay 60-7550 ou stimulée par le GMPc.



**Figure 1R : Dosage de l'hydrolyse de l'AMPc par les PDEs dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.** L'activité PDE-AMPc a été mesurée en présence de 1  $\mu$ M de [ $^3$ H]-AMPc. Le profil d'activité des PDE-AMPc a été déterminé en absence (activité totale) ou en présence de l'inhibiteur non sélectif des PDE, IBMX (1 mM) ou d'un inhibiteur sélectif d'une

famille de PDE (PDE1 : MIMX, 10  $\mu$ M; PDE2 : BAY 100 nM; PDE3 : Cil, 1  $\mu$ M; PDE4 : Ro, 10  $\mu$ M). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de 3 expériences indépendantes.

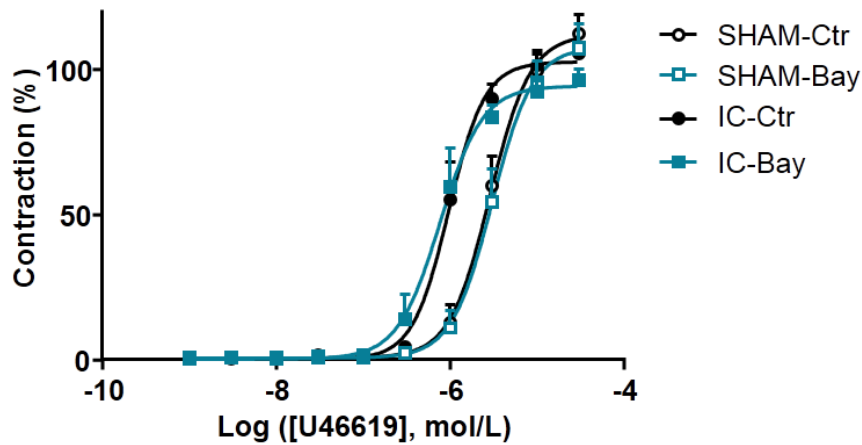
## **2.2. Effet de l'inhibition des PDEs sur la réponse contractile des segments d'artères mésentériques de rats SHAM et IC**

La contribution des principales familles de PDE3 et PDE4 dans le contrôle du tonus vasculaire de l'aorte de rat IC et SHAM a préalablement été explorée par notre équipe (Hubert et al., 2014). Le rôle de la PDE2 a par la suite été exploré par l'étude de la réponse contractile à une prostaglandine vasoconstrictrice, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , sur des segments d'aorte de rat IC et SHAM préalablement incubés avec l'inhibiteur sélectif de PDE2 : BAY, 100 nM (Figure 2R ci dessous). Les résultats indiquent que le BAY ne modifie pas la réponse contractile à la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans les deux groupes de rats IC et SHAM.

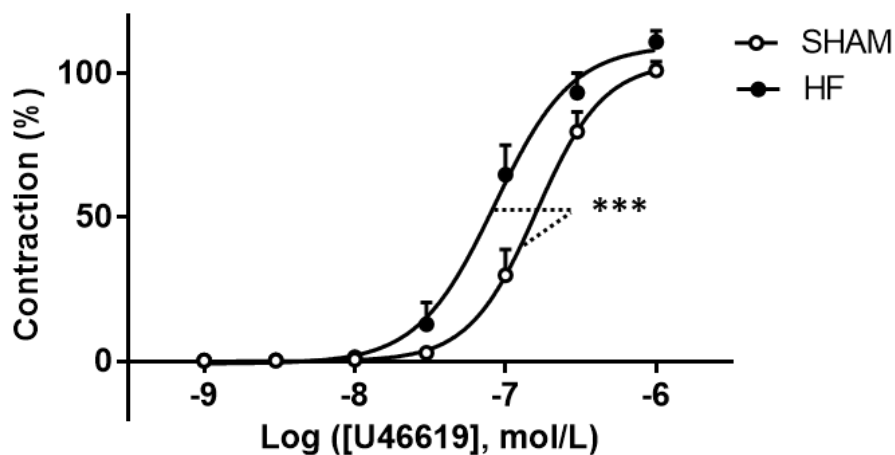
Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle de ces familles de PDE dans le contrôle du tonus vasculaire de l'artère mésentérique chez les rats IC et SHAM, nous avons d'abord étudié la réponse contractile à l'U46619. Pour cela, les segments d'artères mésentériques ont été au préalable incubés en présence des inhibiteurs sélectifs de PDE2 : BAY, 100 nM, de PDE3 : Cil, 1  $\mu$ M ou PDE4 (Ro, 10  $\mu$ M) avant de réaliser une courbe concentration-effet à l'U46619. Chez les rats SHAM, seul le BAY et le Ro ont « retardé » le développement de la réponse contractile à l'U46619 ce qui se traduit par un décalage significatif de la courbe vers la droite (Figure 4R, A) par rapport au contrôle. Ce décalage est objectivé par la diminution significative des  $\text{pD}_2$  en présence de BAY et Ro (Figure 4R, B) en comparaison au contrôle. Seul le Ro a diminué significativement l'effet maximal ( $P < 0,05$ , données non représentées).

Chez les rats IC, la réponse contractile à l'U46619 est également significativement potentialisée en comparaison au rats SHAM (Figure 2,  $\text{pD}_2 = 6,72 \pm 0,07$  chez les SHAM et  $\text{pD}_2 = 7,05 \pm 0,09$  ; \* :  $P < 0,05$ ). De plus, il est retrouvé un effet significatif du BAY et du Ro sur la réponse contractile à l'U46619. De manière intéressante, un effet du Cil est cette fois observé (Figure 4R, C). L'ensemble de ces effets sont objectivés par une diminution significative des  $\text{pD}_2$  (Figure 4R, D) en présence de chacun des 3 inhibiteurs de PDE testés, alors que l'effet maximal des réponses n'a pas montré de différence significative.

Ces résultats révèlent donc, d'une part, une hyperréactivité des artères des rats IC à l'U46619 en comparant aux rats SHAM. D'autre part ils indiquent une implication des PDE2 et PDE4 dans la régulation d'une réponse à un agent contractant, l'U46619, tandis que le rôle de la PDE3 n'est révélé que dans l'IC.

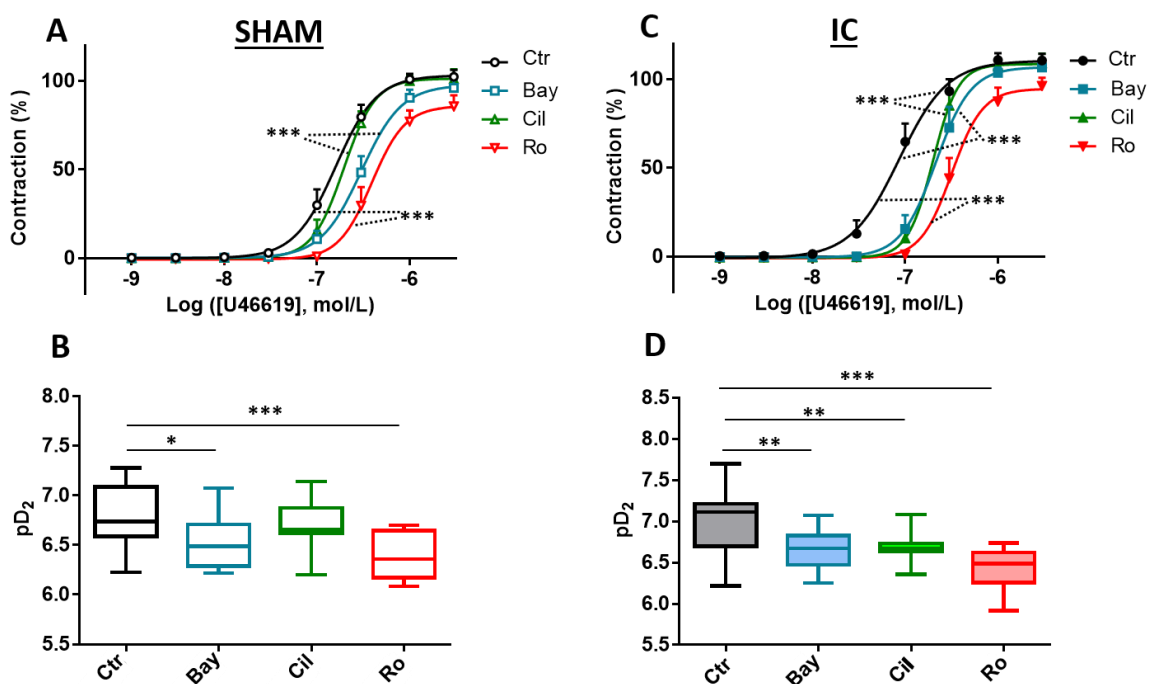


**Figure 2R : Réponse contractile à des concentrations cumulatives de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans les aortes isolées de rats SHAM et IC.** Les courbes concentration-effet à la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-9}$  M à  $3.10^{-5}$  M) ont été réalisées en présence de l'inhibiteur sélectif de PDE2 (BAY, 100 nM) ou du véhicule DMSO (Ctr). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de N = 5-7.



**Figure 3R : Réponse contractile à des concentrations cumulatives d'U46619 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM et IC.** Les courbes concentration-effet à l'U46619 ( $10^{-9}$  M à  $3.10^{-6}$  M) ont été réalisées sur des segments d'artères mésentériques isolées de rat SHAM et IC. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de N = 9-16, \*\*\* :  $P < 0,001$ .





**Figure 4R : Effet de l'inhibition de la PDE2, PDE3 et PDE4 sur la réponse contractile induite par des concentrations cumulatives d'U46619 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM (A, B) et IC (C, D).** Les courbes concentration-effet à l'U46619 ( $10^{-9}$  M à  $3.10^{-6}$  M) ont été réalisées en présence de l'inhibiteur sélectif de PDE2 (BAY, 100 nM) ou de PDE3 (Cil, 1  $\mu$ M) ou PDE4 (Ro, 10  $\mu$ M) ou de leur véhicule DMSO (Ctr). Les contractions sont exprimées en pourcentage de l'amplitude de la réponse à la solution « K80 ». B et D représentent respectivement les pD<sub>2</sub> des courbes en A et C. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de N = 9-16. \* : P < 0,05; \*\* : P < 0,01; \*\*\* : P < 0,001 *versus* Ctr (ANOVA (2 voies pour mesure répétées pour A et C; 1 voie pour B et D)).

### 2.3. Effet de l'inhibition de la PDE2 sur la réponse relaxante à l'ANP et DEA-NO dans les segments d'artères mésentériques de rats SHAM et IC

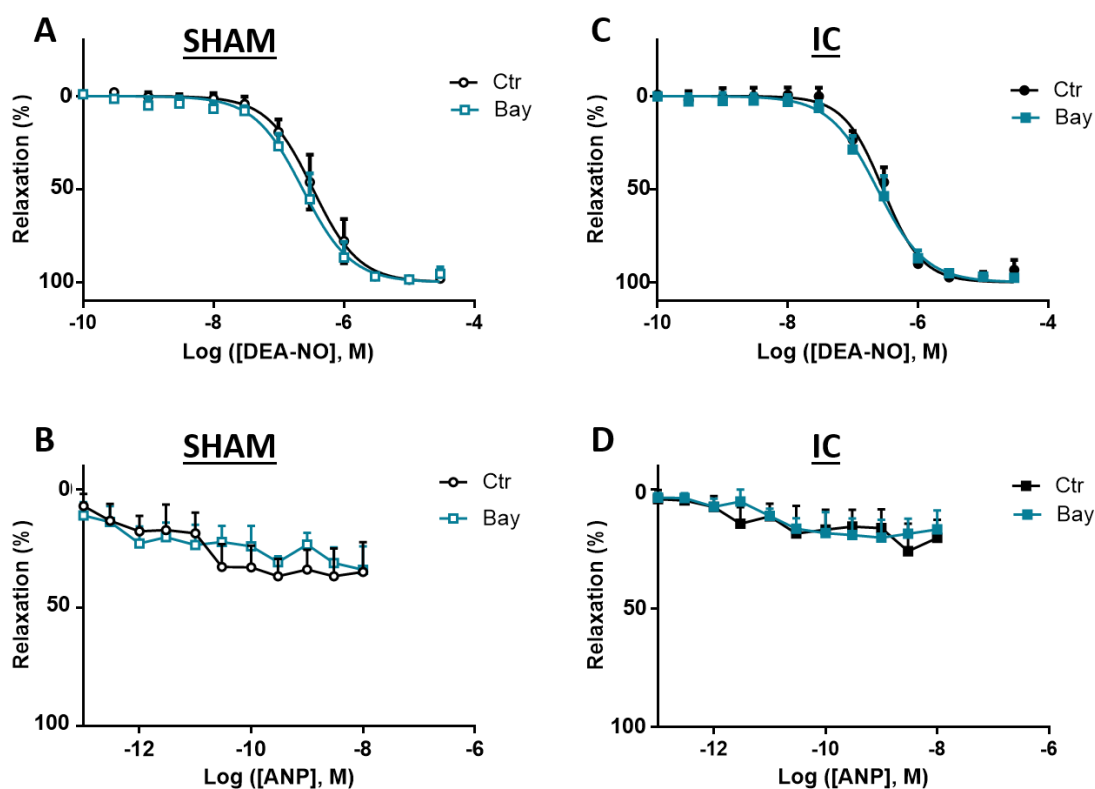
Au vu des précédant résultats, il semblerait que la PDE2 aie un rôle important dans la régulation du tonus contractile des artères mésentériques. C'est pourquoi, nous avons évalué son implication dans les réponses vasorelaxantes à des agents stimulant les voies de synthèse du GMPc.

Les segments d'artères mésentériques ont été incubés en présence de l'inhibiteur de PDE2, BAY à 100 nM. Après contraction à l'U46619, nous avons appliqué des concentrations croissantes et cumulatives d'un donneur de NO, le DEA-NO ( $10^{-10}$  M à  $3.10^{-5}$  M) et du peptide natriurétique ANP ( $10^{-13}$  M à  $10^{-8}$  M), (Figure 5R).

Le DEA-NO a induit une réponse relaxante complète dans les deux groupes SHAM et IC tandis que l'ANP n'a induit qu'une faible relaxation.

Le pré-traitement au BAY ne semble pas modifier ces réponses. L'évaluation des  $pD_2$  pour la réponse au DEA-NO indique les valeurs suivantes : chez les SHAM, la  $pD_2$  de la réponse « contrôle » est de  $6,47 \pm 0,05$ , alors qu'en présence de BAY, elle est de  $6,63 \pm 0,05$  ( $N = 7$ ); chez les IC, la  $pD_2$  pour le contrôle est de  $6,53 \pm 0,04$ , en présence de BAY, elle est de  $6,62 \pm 0,05$  ( $N = 4$ ). La relaxation peu prononcée obtenue en présence d'ANP ne permet pas de quantifier la  $pD_2$ .

Ces résultats suggèrent que la PDE2 n'est pas impliquée dans la réponse relaxante médiée par le GMPc produit de façon stimulée dans les CMLs d'artère mésentérique de rat SHAM ou IC.



**Figure 5R : Effet de l'inhibition de PDE2 sur la réponse relaxante induite par des concentrations cumulatives de DEA-NO (A, C) et d'ANP (B, D) dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM (A, B) et IC (C, D).** Les courbes concentration-effet au DEA-NO ( $10^{-10}$  M à  $3 \cdot 10^{-5}$  M) et à l'ANP ( $10^{-13}$  M à  $10^{-8}$  M) ont été réalisées sur des segments d'artères mésentériques isolées de rat SHAM (A, B) et IC (C, D), en présence de l'inhibiteur sélectif de PDE2 (BAY, 100 nM) ou de son véhicule DMSO (Ctr). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de  $N = 4-7$ .

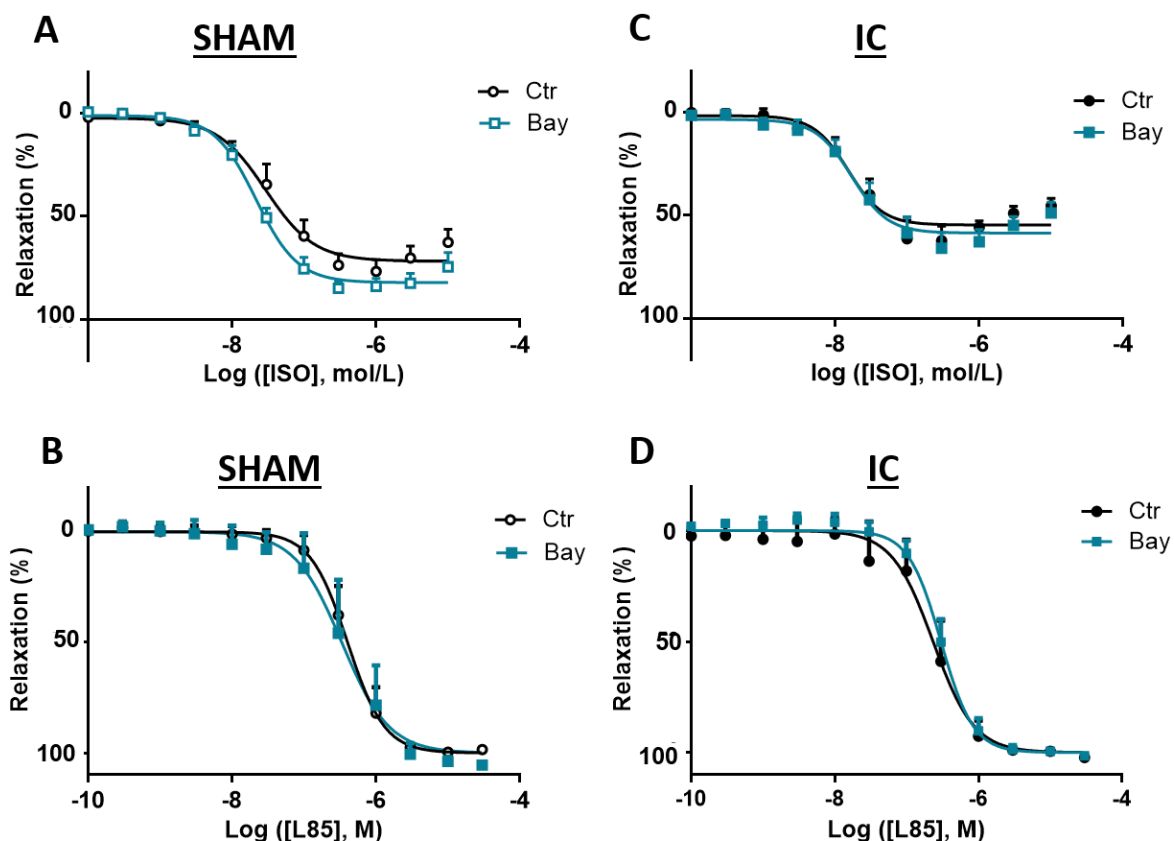
## **2.4. Effet de l'inhibition de la PDE2 sur la réponse relaxante à l'isoprénaline et au L858051 dans les segments d'artères mésentériques de rats SHAM et IC**

Pour cette dernière série d'expériences, nous avons évalué l'implication de la PDE2 dans la voie relaxante de l'AMPc. De la même manière que le protocole décrit précédemment (partie 2.3 des résultats) nous avons incubé les segments d'artères mésentériques en présence de BAY à 100 nM. Par la suite nous avons étudiés l'effet de concentration croissante d'isoprénaline (ISO) et de L858051 (L85) sur des artères pré-contractées à l'U46619.

L'ISO ainsi que le L85 ont induit un effet relaxant dont l'amplitude augmente avec la concentration appliquée (Figure 6R). Contrairement au L85, l'ISO n'a pas induit de relaxation complète dans les deux groupes SHAM et IC et de manière intéressante, son efficacité est significativement diminuée chez les rats IC ( $E_{\max} (\%) = 73 \pm 0,05$  pour le groupe SHAM et  $E_{\max} (\%) = 56,26 \pm 0,05$  pour le groupe IC ; \* :  $P < 0,05$ ). Ces résultats suggèrent une altération de la réponse relaxante  $\beta$ -adrénergique dans les artères mésentériques lors de l'IC.

Le traitement au BAY n'a pas modifié la réponse relaxante à l'ISO, ni au L85 dans les deux groupes SHAM et IC (pour la réponse ISO : dans le groupe SHAM : la  $pD_2$  pour le contrôle est de  $7,54 \pm 0,10$ , alors qu'en présence de BAY elle est de  $7,68 \pm 0,06$  ; dans le groupe IC, la  $pD_2$  pour le contrôle est de  $7,81 \pm 0,10$  et de  $7,77 \pm 0,05$  en présence de BAY. Pour la réponse au L85, dans le groupe SHAM, la  $pD_2$  pour le contrôle est de  $6,39 \pm 0,05$  *versus*  $6,47 \pm 0,09$  en présence de BAY, et dans le groupe IC, la  $pD_2$  pour le contrôle est de  $6,63 \pm 0,08$  et de  $6,52 \pm 0,03$  pour le groupe BAY. Ces résultats suggèrent que la PDE2 n'est pas impliquée dans la réponse relaxante médiée par l'AMPc produit de façon stimulée dans les CMLs d'artère mésentériques de rat SHAM et IC.

Nous avons par la suite tenté d'évaluer l'expression de la PDE2 dans des artères mésentériques. Afin de mettre au point cette détection nous avons utilisé du tissu de rat jeune. Pour cela nous avons utilisés comme contrôle positif des extraits de cœurs de souris sur-exprimant la PDE2A humaine (Vettel et al., 2016). Nous avons aussi chargés différentes quantité de protéines de nos échantillons (50  $\mu$ g, 150  $\mu$ g et 200  $\mu$ g). Des résultats préliminaires ont permis de détecter la PDE2 détectée dans les extraits de cœurs de souris transgénique. Cependant, la PDE2 native n'a pas été clairement détectée dans les artères de rat, ni dans les cœurs de souris sauvages. La question de la présence de la PDE2 dans ce tissu reste donc à traiter.



**Figure 6R :** Effet de l'inhibition de PDE2 sur la réponse relaxante induite par des concentrations cumulatives d'isoprénaline ou de L85 dans les artères mésentériques isolées de rats SHAM (A) et IC (B). Les courbes concentration-effet à l'isoprénaline (ISO,  $10^{-10}$  M à  $10^{-5}$  M, A, C) ou L85 ( $10^{-10}$  M à  $3 \cdot 10^{-5}$  M, B, D) ont été réalisées sur des segments d'artères mésentériques isolées de rat SHAM (A, B) et IC (C, D), ou de son véhicule DMSO (Ctr). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ESM de N = 9-16.

### 3. Conclusion

Ce travail avait pour but, dans un premier temps, d'explorer le rôle des PDE2, PDE3 et PDE4 dans les artères de résistances dans un modèle d'IC induite par surcharge de pression chez le rat. Les principaux résultats sont les suivants :

- Les artères mésentériques prélevées de rats IC présentent une hyper-réactivité aux agents contractants.
- Un effet inhibiteur du BAY sur la contraction induite par l'U46619 a été mis en évidence, à la fois sur les tissus de rat SHAM et IC. Cette observation suggère que la PDE2 exerce une influence favorisant la contraction du muscle lisse vasculaire à cet agent contractant. Cet effet n'avait pas été observé dans l'aorte contractée par une prostaglandine, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Cette

comparaison suggère que la contribution de la PDE2 serait spécifique de certains lits vasculaire, ou selon l'agent contractant utilisé. En revanche, l'établissement de l'IC ne semble pas influencer sur cette contribution éventuelle de la PDE2.

- Dans les artères mésentériques prélevées de rats SHAM et IC, la voie relaxante du GMPc ne semble pas être modifiée par l'inhibition de la PDE2. Pour la voie de signalisation impliquant l'AMPc, seule la stimulation spécifique des récepteurs  $\beta$ -adrénergique est légèrement diminuée dans le groupe IC.

- L'emploi de protocoles standard de mesure de l'expression protéique ou de l'activité d'hydrolyse de la PDE2 pour l'AMPc n'a pas permis de confirmer l'expression de l'enzyme dans les artères mésentériques de rat.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un rôle fonctionnel de la PDE2 dans des NCs en condition « non-stimulée », dans les artères mésentériques et ce malgré une probable très faible abondance de cette protéine dans au niveau tissulaire. Bien que le BAY a été utilisé à une concentration décrite comme sélective vis-à-vis d'autres PDEs (Boess et al., 2004) des effets « non –sélectifs » résultat d'interactions du composé avec d'autres cibles que la PDE2 ne peuvent être exclus. En effet, la réalité de l'expression de la PDE2 pose question et devra être précisée pour conforter les résultats obtenus avec un inhibiteur pharmacologique.

Les dosages biochimiques (activité et expression de la PDE2) encore préliminaires devront être optimisés. Une alternative à ces techniques seraient la détection des transcrits de la PDE2 par PCR « quantitative » ou par immuno- marquage de coupes d'artères ou de cellules isolées (CMLs, CE) d'artères mésentériques.

Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur le rôle de la PDE2 dans certaines réponses contractiles d'un type d'artère de résistance. Cette contribution semble être conservée dans l'IC.

# Discussion et perspectives

L'objectif de mes travaux de thèse était d'étudier le rôle des PDE2, PDE3 et PDE4 dans la régulation du tonus des artères de résistances, ainsi que les altérations de ces contributions rencontrées dans un modèle physiopathologique d'IC. Cette étude a été réalisée dans deux modèles, l'artère coronaire et l'artère mésentérique. Le mécanisme par lequel ces PDEs régulent le tonus vasculaire a été exploré *ex-vivo*, sur des segments d'artères isolées puis par des approches complémentaires à l'échelle cellulaire et par méthode biochimique (dosage d'activité enzymatique et Western blot) et immunocytochimique (*Proximity Ligation Assay*).

Le volet majeur de mon projet de thèse était d'évaluer un mécanisme par lequel les PDE3 et PDE4 régulent le tonus de l'artère coronaire. Et plus exactement, l'implication spécifique des canaux BK<sub>Ca</sub>. Cette étude avait aussi pour but d'expliquer les altérations de la vasomotricité de l'artère coronaire rencontrées lors de l'IC (Kingsbury et al., 2000; McGoldrick et al., 2007).

Par ailleurs j'ai participé à une autre étude visant à documenter les altérations globales de la régulation du tonus vasculaire par les PDEs rencontrées au cours de l'IC, sur le modèle de l'artère mésentérique. Ce travail fait suite à une précédente étude réalisée dans notre laboratoire (Hubert et al., 2014) sur l'aorte de rats soumis à un modèle d'IC identique à celui employé dans notre étude. De manière complémentaire, l'étude de l'artère mésentérique, un vaisseau résistif aux caractéristiques distinctes, pourrait révéler un impact différentiel de la pathologie sur les différents types de lit vasculaire. Il a été observé une contribution spécifique de la PDE2 dans la régulation du tonus de l'artère mésentérique, qui n'avait cependant pas été observée dans l'aorte. Il était donc nécessaire d'explorer d'avantage le rôle de la PDE2 dans ce tissu.

### **« Rôle des PDE3 et PDE4 dans la régulation de la vasomotricité de l'artère coronaire : implication des BK<sub>Ca</sub> et évolution lors de l'insuffisance cardiaque »**

Ce travail avait pour but d'étudier, dans l'artère coronaire, l'implication de la PDE3 et PDE4 dans la régulation du tonus contractile ainsi que leur rôle dans la voie relaxante de l'AMPC. Plus particulièrement, nous avons cherché à mettre en évidence le mécanisme moléculaire par l'intermédiaire duquel ces enzymes exercent le contrôle de la vasomotricité, c'est-à-dire les effecteurs moléculaires qui en sont leur cible, par analogie à des travaux réalisés dans un autre modèle cellulaire : le cardiomyocyte (Leroy et al., 2011). Ce travail préliminaire a permis d'expliquer les mécanismes physiopathologiques qui seraient responsables en partie de la dysfonction coronaire observée dans l'IC.

- **Rôle de la PDE3 et PDE4 dans la régulation de la vasomotricité de l'artère coronaire : implication des BK<sub>Ca</sub>**

L'utilisation d'une approche radioenzymatique pour le dosage de l'activité PDE a permis de caractériser les principales familles hydrolysant l'AMPc dans l'artère coronaire gauche de rat. Nous avons donc constaté que les familles de PDE3 et PDE4 contribuaient respectivement à la moitié et au tiers de l'activité totale. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude réalisée dans notre laboratoire sur l'aorte de rat avec le même protocole (Hubert et al., 2014) ainsi que d'autres études de la littérature (Komas et al., 1991; Lugnier and Schini, 1990).

Par la suite, nous avons mis en évidence le rôle fonctionnel de ces deux familles de PDEs par un protocole *ex-vivo* sur des segments d'ACG isolés. L'application d'une concentration sélective d'inhibiteur de PDE3 ou PDE4 (Rich et al., 2001; Sudo et al., 2000b), sur les artères pré-contractées à l'U46619 induit une réponse relaxante, préalablement décrite dans l'artère coronaire porcine (Kaneda et al., 2010) et humaine (Lindgren and Andersson, 1991b) mais aussi dans d'autres lits vasculaires comme l'artère pulmonaire, rénale (Lindgren and Andersson, 1991b) et l'aorte de rat (Eckly et al., 1994; Komas et al., 1991; Lindgren et al., 1990). Cette réponse relaxante est potentialisée lors de l'inhibition concomitante de la PDE3 et de la PDE4. Ceci est cohérent avec les données de la littérature dans lesquelles il a été rapporté une amplification de la réponse relaxante (Hubert et al., 2014; Komas et al., 1991; Lindgren et al., 1991b), et une augmentation de la concentration d'AMPc (Eckly and Lugnier, 1994; Schoeffter et al., 1987) produite par l'inhibiteur de PDE4 lorsque ce dernier est appliqué en présence de l'inhibiteur de PDE3.

Du fait de la participation des canaux BK<sub>Ca</sub> dans la voie de signalisation de l'AMPc contrôlant le tonus vasculaire au sein de l'artère coronaire (Price et al., 1996), nous avons évalué leur implication dans la vasorelaxation induite par l'inhibition pharmacologique des PDE3 et PDE4. Nous avons montré que l'IBTX, inhibiteur sélectif des BK<sub>Ca</sub> (Galvez et al., 1990), abroge la réponse pro-relaxante à l'inhibiteur de PDE3, de PDE4 ou aux deux simultanément. Ces résultats suggèrent que, dans notre modèle d'étude, les PDE3 et PDE4 régulent le tonus contractile en dégradant l'AMPc produit constitutivement, impliqué dans l'activation des BK<sub>Ca</sub> (Figure 1D). Quelques études ont évalué le rôle des BK<sub>Ca</sub> dans l'effet relaxant dû à l'inhibition de la PDE3/PDE4 dans d'autres lits vasculaires. En ce qui concerne l'inhibition de la PDE3, le rôle des BK<sub>Ca</sub> ne semblent pas être majeur dans l'artère pulmonaire humaine ou de cochon d'Inde (Bardou et al., 2002; Rieg et al., 2013) alors que dans l'aorte de lapin, le cilostazol, un inhibiteur de PDE3 induit un effet relaxant qui est complètement aboli lorsque les BK<sub>Ca</sub> sont



inhibés par la paxilline (Li et al., 2015). L'étude de Kaneda (Kaneda et al., 2010) réalisée dans l'artère coronaire porcine mentionne que l'effet prorelaxant du rolipram, inhibiteur de la PDE4 était partiellement aboli en présence d'IBTX. De la même manière, ce bloqueur de  $BK_{Ca}$  abolit l'effet dépresseur du Ro-20-1724 sur la contraction phasique du muscle de la vessie (Brown et al., 2008; Xin et al., 2014b; Zhai et al., 2014b). Ces résultats soulignent que l'implication des  $BK_{Ca}$  dans les effets relaxants des inhibiteurs de PDE3/PDE4 varie selon les lits vasculaires et les espèces.

Les CMLs expriment diverses familles de canaux potassiques susceptibles de participer dans la voie relaxante de l'AMPC, comme les  $K_v$  et les  $K_{ATP}$  (Morgado et al., 2011; Nelson and Quayle, 1995b). Afin de vérifier si la voie relaxante des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 implique spécifiquement les  $BK_{Ca}$ , nous avons réalisé les mêmes expériences de réactivité vasculaire que précédemment mais en présence du bloqueur des  $K_v$  : 4-aminopyridine et  $K_{ATP}$  : le glibenclamide. Ni l'un, ni l'autre n'ont altéré la réponse relaxante induite par l'inhibition de la PDE3 et PDE4 ce qui confirme l'implication spécifique des  $BK_{Ca}$  dans cette voie de régulation (Figure 1D).

Comme il avait déjà été démontré dans l'aorte de rat (Hubert et al., 2014), une disparition de la réponse relaxante au Ro a été constatée dans les segments d'ACG sur lesquels l'endothélium avait été volontairement détérioré. Ceci pourrait s'expliquer par la levée d'inhibition du GMPc sur l'activité de la PDE3 faisant suite à la suppression de la voie NO/GMPc endothéliale (Eckly and Lugnier, 1994; Komasa et al., 1991). A l'inverse, dans notre modèle et dans les précédents travaux (Hubert et al., 2014) la réponse relaxante au Cil reste préservée en l'absence d'endothélium. De plus, l'effet inhibiteur de l'IBTX sur la réponse relaxante du Cil seul ou combiné au Ro n'est pas affectée par l'absence de l'endothélium. Ces résultats suggèrent que la contribution des  $BK_{Ca}$  dans le contrôle du tonus de l'ACG par les PDE3 et PDE4 est indépendante de l'endothélium (Figure 1D).

Par la suite, nous avons étudié cette voie de signalisation à l'échelle cellulaire par la mesure de l'activité des canaux  $BK_{Ca}$  dans des cellules fraîchement isolées d'ACG. Les expériences que nous avons menées ont révélé une stimulation claire de l'activité des  $BK_{Ca}$  lors de l'inhibition concomitante de la PDE3 et PDE4 alors que l'inhibition d'une seule de ces PDE semble insuffisante pour augmenter la probabilité d'ouverture de ces canaux potassiques. Une récente étude (Li et al., 2015) a rapporté une activation des  $BK_{Ca}$  par le cilostazol, inhibiteur de la PDE3. Au vu de la forte concentration utilisée (10  $\mu\text{mol/L}$ ), on pourrait suspecter l'implication de la PDE5 dans ces effets (Sudo et al., 2000b). C'est pourquoi, il semblerait difficile d'observer un

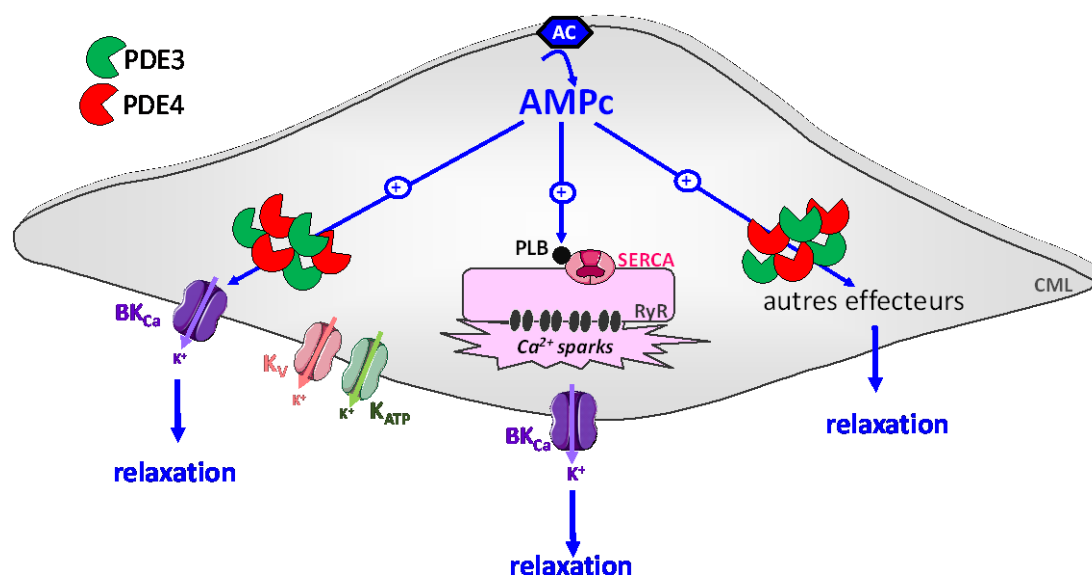
effet par l'inhibition d'une seule famille de PDE, probablement à cause de la faible concentration d'AMPc produite qui parfois peut être aussi sporadique. Cependant, à l'échelle de l'organe, par la sommation de ces effets, il serait possible d'observer un effet physiologique et de le quantifier. Il serait intéressant d'envisager la réalisation du dosage de la [AMPc] par ELISA, au niveau cellulaire afin d'évaluer les amplitudes de variations de sa production basale dans notre modèle.

En accord avec des études précédentes réalisées dans l'aorte de rat (Hubert et al., 2014; Komasa et al., 1991; Maurice et al., 1991; Schoeffter et al., 1987), nos résultats révèlent une potentialisation, par le Ro et le Cil, des réponses relaxantes à des agents élevateurs de la [AMPc], c'est-à-dire l'isoprénaline, agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, et le L85, activateur des adénylates cyclases. De plus les réponses relaxantes à ces agents ont été inhibées par l'IBTX, donnée préalablement rapportée dans l'artère coronaire et cérébrale de lapin (Porter et al., 1998). Il serait intéressant d'évaluer à l'échelle cellulaire, l'impact d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique ou au L85, sur la régulation de l'activité du canal par les PDE3/PDE4. En effet, la mesure de l'activité du canal BK<sub>Ca</sub> par patch-clamp permettrait de confirmer cette voie de régulation à l'échelle moléculaire.

A notre connaissance, l'implication des BK<sub>Ca</sub> dans l'effet potentialisateur du Ro et du Cil n'a jamais été rapportée auparavant. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence d'une plateforme macromoléculaire associant les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques, les BK<sub>Ca</sub>, les LTCC ainsi qu'une protéine d'ancrage AKAP79/150 décrite notamment dans les CMLs d'aorte de rat (Liu et al., 2004b). Dans d'autres types cellulaires comme le cardiomyocyte, les PDEs peuvent s'associer aux effecteurs de l'AMPc (LTCC, PLB/SERCA...) afin de moduler la réponse  $\beta$ -adrénergique (revue par Mika et al., 2012). De plus, nos expériences de PLA suggèrent une colocalisation des BK<sub>Ca</sub> avec la PDE3 et PDE4. Il serait donc intéressant d'évaluer l'existence d'une colocalisation entre les  $\beta$ -ARs et les PDE3/PDE4 ou les BK<sub>Ca</sub> dans les CMLs d'ACG.

A l'issue de ces résultats, il est possible de supposer que les PDE3 et PDE4 régulent le tonus de l'ACG *via* les BK<sub>Ca</sub> à de faible concentration d'AMPc, (production basale d'AMPc) (Figure 1D) ou lors d'une production d'AMPc suite à une stimulation d'un récepteur spécifique (stimulation  $\beta$ -adrénergique) (Figure 2D (A)). Tandis que la stimulation des adénylates cyclases entraîne une production massive d'AMPc dans toute la cellule, responsable du recrutement d'autres effecteurs que les BK<sub>Ca</sub> (Figure 2D (B)). Un dosage des [AMPc] serait envisageable afin de comparer la quantité d'AMPc produite lors des deux types de stimulation.

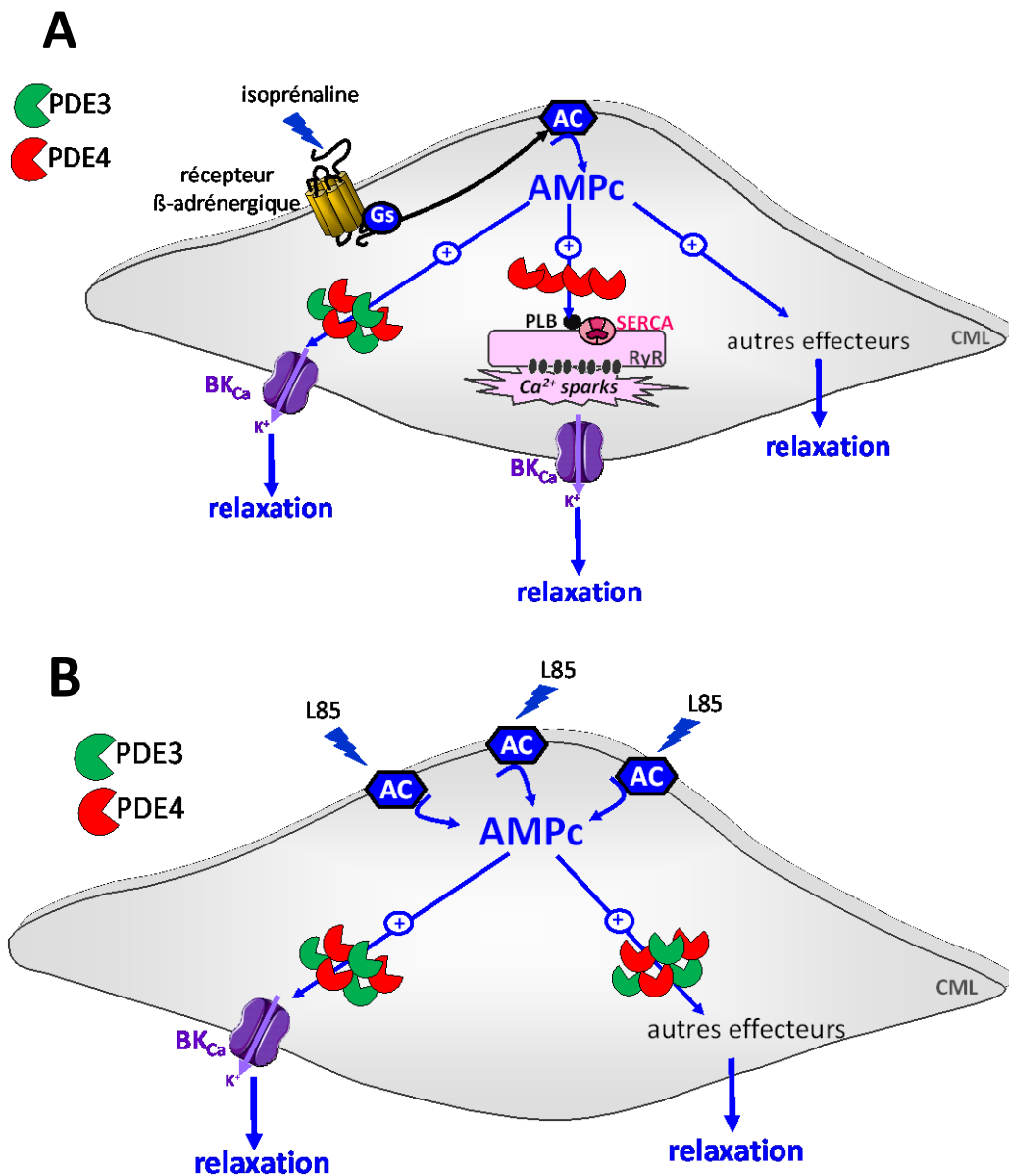
Il est clairement établi l'existence, dans les CMLs, d'un couplage entre les canaux  $BK_{Ca}$  et les RyR (Nelson et al., 1995). De plus, il a été décrit que les déterminants moléculaires (RyR et PLB/SERCA) à l'origine des *sparks* calciques dans la CMLV sont des cibles des effecteurs de la voie AMPc, la PKA mais aussi Epac (Porter et al., 1998; Roberts et al., 2013b). Le couplage des *sparks* calciques avec le canal  $BK_{Ca}$  peut notamment être impliqué dans la voie relaxante de l'AMPc (Porter et al., 1998). Dans notre modèle, les RyR ne semblent pas impliqués dans l'effet relaxant des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 en condition basale (Figure 1D), tandis que lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique, les RyR constituent d'importants effecteurs de cette réponse mais sont surtout indispensables à l'effet potentialisateur du Ro sur la réponse à l'isoprénaline (Figure 2D (A)). Une possible explication serait que la quantité d'AMPc nécessaire à recruter les RyR soit insuffisante en condition basale mais suffisante lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique. Une autre possibilité est l'association spécifique des RyR à certaines PDEs. Des études réalisées dans le muscle lisse de la vessie ont décrit une augmentation de la fréquence des *sparks* calciques ainsi que l'activité des canaux  $BK_{Ca}$  par le rolipram (Xin et al., 2014a; Zhai et al., 2014b). Ces résultats soulignent le rôle de la PDE4 dans la régulation du couplage RyR- $BK_{Ca}$  dans le muscle lisse. La mesure des *sparks* calciques par microscopie confocale permettrait d'évaluer l'implication des RyR à l'échelle cellulaire en condition basale et stimulée de production d'AMPc.



**Figure 1D : Schéma récapitulatif du rôle des canaux  $BK_{Ca}$  dans la régulation du tonus de l'artère coronaire basale par les PDE3 et PDE4.**

Dans l'artère coronaire de rat, les PDE3 et PDE4 contrôlent les concentrations d'AMPc basales et leur inhibition entraîne la relaxation. La CML exprime de nombreux canaux potassiques tels que les  $K_v$ ,  $K_{ATP}$  et les  $BK_{Ca}$ . Seuls les  $BK_{Ca}$  sont impliqués dans l'effet relaxant des inhibiteurs de PDE3 et PDE4. De plus, leur régulation n'implique pas les *sparks* calciques.

AC : adénylate cyclase, CML : cellule musculaire lisse, Kv : canaux potassiques dépendant du voltage,  $K_{ATP}$  : canaux potassiques sensibles à l'ATP, PLB : phospholamban, RS : réticulum sarcoplasmique, RyR : récepteurs à la ryanodine, SERCA : pompe  $Ca^{2+}$  ATPase du RS.



**Figure 2D : Schéma récapitulatif du rôle des canaux  $BK_{Ca}$  dans la régulation du tonus de l'artère coronaire par les PDE3 et PDE4 sous stimulation  $\beta$ -adrénergique (A) et activation des adénylates cyclases (B).**

Dans l'artère coronaire de rat, les PDE3 et PDE4 contrôlent les concentrations d'AMPc produit de façon stimulée et leur inhibition potentialise cette réponse relaxante. Les canaux  $BK_{Ca}$  constituent d'importants effecteurs de l'AMPc produit de façon stimulée et leur activité peut être stimulée par les *sparks* calciques.

AC : adénylate cyclase, CML : cellule musculaire lisse, PLB : phospholamban, RS : réticulum sarcoplasmique, RyR : récepteurs à la ryanodine, SERCA : pompe  $Ca^{2+}$  ATPase du RS.

## - **Altération du signalosome PDE3/PDE4-BK<sub>Ca</sub> dans l'insuffisance cardiaque**

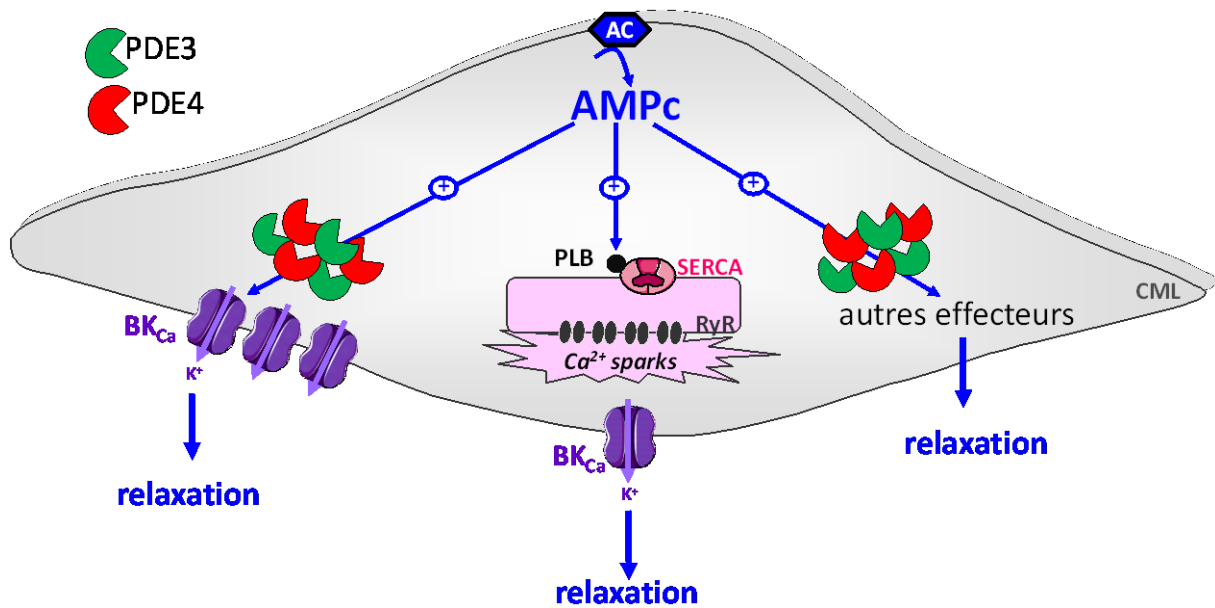
Dans cette deuxième partie de l'étude, nous avons évalué le rôle du signalosome impliquant PDE3/PDE4 et le BK<sub>Ca</sub> dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat. Il s'agit d'un modèle où la pathologie est induite par surcharge de pression, 22 semaines après sténose de l'aorte ascendante (Hubert et al., 2014; Joubert et al., 2008). L'artère coronaire étant située en amont du clip, est soumise à des conditions de pression élevée, identique à celle du ventricule gauche, et vraisemblablement responsables d'une grande souffrance tissulaire (Kingsbury et al., 2000; McGoldrick et al., 2007). Ce modèle pathologique est couramment utilisé car il mime l'apparition progressive de l'IC en clinique. En effet, il y a d'abord un passage par le stade d'hypertrophie puis une évolution vers l'IC (Camacho et al., 2016). Un autre modèle d'IC est aussi couramment utilisé car il mime les conditions de développement de l'IC en clinique. Ce modèle consiste en l'induction d'un infarctus par ligature de l'artère coronaire gauche. Il aurait été intéressant de l'utiliser dans notre étude, cependant cela aurait exigé d'utiliser une autre branche l'artère coronaire, d'accès plus délicat (Camacho et al., 2016).

La contribution des BK<sub>Ca</sub> dans l'effet relaxant des inhibiteurs de PDE3 et PDE4 a été retrouvé chez les rats contrôles SHAM tandis qu'elle était absente dans le groupe de rat IC (Figure 3D). Ceci pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du canal BK<sub>Ca</sub> observée au cours de l'IC. Une telle altération a déjà été rapportée dans les artères mésentériques de souris ayant développé une IC suite à un infarctus du myocarde (Wan et al., 2013) et dans d'autres modèles de pathologies cardiovasculaires comme le diabète et l'hypertension (Hu and Zhang, 2012) dans lesquelles il a été rapporté une diminution de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  et/ou  $\beta$ . De plus, il a été constaté une augmentation de l'expression d'une isoforme de la PDE4B d'une taille de  $\approx 70$  kDa. Il pourrait s'agir du variant PDE4B2, décrit précédemment dans l'artère pulmonaire humaine (Millen et al., 2006). Cette observation a aussi été retrouvée dans l'aorte de rat dans le même modèle d'IC (Hubert et al., 2014). La présence d'une autre forme à  $\approx 100$  kDa de la PDE4B dans les tissus d'ACG indiquerait une possible contamination de la préparation par du tissu cardiaque. En effet, l'utilisation du même anticorps n'a pas révélé l'existence de cette forme longue dans l'aorte de rat, plus aisée à débarrasser de tissus non vasculaire (Hubert et al., 2014). Cependant elle a été détectée dans les cardiomyocytes de rat (Abi-Gerges et al., 2009). L'étude de l'expression de la PDE4B sur des CMLs isolées permettrait de confirmer les isoformes de PDE4B spécifiques à ce tissu.

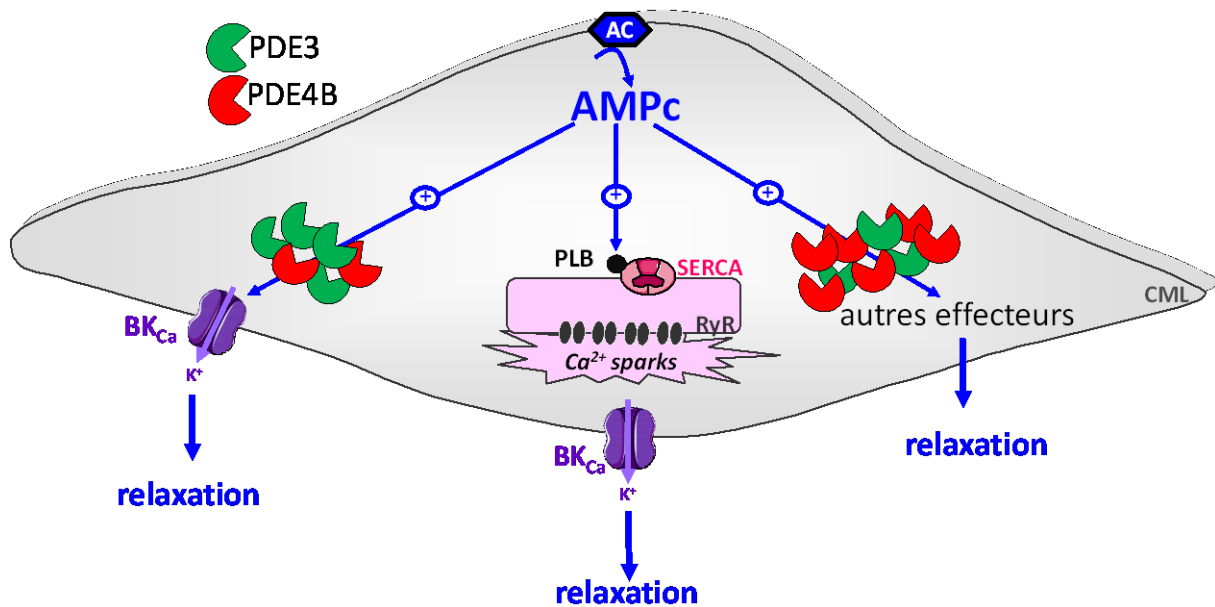
De manière intéressante, l'étude de la proximité protéique indique une diminution de près de 50% de la colocalisation entre les BK<sub>Ca</sub> et la PDE4B dans les CMLs isolées de rats IC. Ce résultat est en accord avec la diminution de l'expression des BK<sub>Ca</sub>, qui semble alors être le facteur limitant dans cette association macromoléculaire (Figure 3D). Le signal du complexe BK<sub>Ca</sub>-PDE3A n'est cependant pas significativement modifié en condition d'IC. Ceci pourrait être expliqué par la localisation de ce complexe dans des niches impliquant une faible proportion de ces protéines et non pas la totalité. De plus, les données de réactivité vasculaire indiquent un effet relaxant de l'inhibiteur de PDE3, plus important lors de l'IC. Ceci pourrait suggérer que cette PDE recrute d'autres effecteurs que les BK<sub>Ca</sub>. L'augmentation de l'activité de la PDE3 lors de l'IC résulterait de la levée d'inhibition par la voie NO/GMPc résultant de la dysfonction endothéliale (Hubert et al., 2014; Komasa et al., 1991).

Enfin, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la diminution de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du canal BK<sub>Ca</sub> sur l'effet potentialisateur des inhibiteurs de PDE3/PDE4 lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique ou activation des adénylates cyclases. Ces expériences pourraient apporter un éclairage partiel sur la diminution des réponses relaxantes à l'isoprénaline et au L85 observées dans l'étude de Kingsbury et McGoldrick (Kingsbury et al., 2000; McGoldrick et al., 2007) réalisées sur des artères coronaires de cochon d'inde atteint d'IC (modèle IC par surcharge de pression).

### Chez les SHAM



### Chez les IC



**Figure 3D : Schéma récapitulatif de la dérégulation du couplage BK<sub>Ca</sub>-PDE3/PDE4 dans l'insuffisance cardiaque.**

Dans l'artère coronaire de rat, les PDE3 et PDE4 contrôlent les concentrations basales d'AMPc. Chez les SHAM, ces PDEs sont couplées aux canaux BK<sub>Ca</sub>. Lors de l'IC, l'expression des BK<sub>Ca</sub> diminue ainsi que leur colocalisation avec la PDE4B.

AC : adénylate cyclase, CML : cellule musculaire lisse, PLB : phospholamban, RS : réticulum sarcoplasmique, RyR : récepteurs à la ryanodine, SERCA : pompe Ca<sup>2+</sup> ATPase du RS.

## **« Rôle des PDEs-AMPc dans la régulation du tonus vasculaire au cours de l'insuffisance cardiaque : Étude d'un modèle de vaisseau résistif, l'artère mésentérique »**

Dans cette deuxième partie de mon travail, nous nous sommes intéressés au rôle fonctionnel des PDE3, PDE4 et surtout la PDE2. Nous avons traité la problématique du rôle de ces enzymes dans le contrôle de la vasomotricité d'une artère de résistance, et leur altération potentielle en situation pathologique. Le modèle d'IC utilisé a été validé préalablement au laboratoire et est présenté par une publication antérieure (Hubert et al., 2014) ainsi qu'à l'occasion de la description de notre première étude. Il sera ainsi intéressant de comparer nos résultats de ceux de l'étude précédente effectuée au laboratoire (Hubert et al., 2014) dans laquelle le dosage d'activité a été réalisé dans des aortes de rat, en utilisant les même protocole et modèle pathologique. Dans cette étude, l'IC n'a pas eu d'impact sur l'activité totale ou des PDEs étudiées. Les résultats obtenus ici montrent au contraire que les artères mésentériques isolées des rats IC présentent une activité totale et un profil d'activité des PDEs diminués à ceux des artères mésentériques isolées de rats SHAM. Ceci semble être expliqué par la diminution de l'activité PDE3 observée dans le groupe IC. Cependant, ces différences entre les artères mésentériques des deux groupes de rats ne sont pas significatives, probablement parce que le nombre d'expérience est faible ( $N = 3$ ). Ces résultats devront être complétés par des expériences additionnelles. A l'inverse, une autre étude réalisée dans un modèle d'IC développée par surcharge volumétrique (rat Dahl traité au sel) (Takahashi et al., 2002) a rapporté une augmentation de l'activité PDE3, sans modification de l'activité PDE4, dans l'aorte rat malade. Ces résultats suggèrent que les altérations d'activité PDE varient selon les lits vasculaires et le modèle pathologique étudié. Ceci pourrait être confirmé par l'étude de l'expression des PDE3, PDE4 et PDE2 et PDE1 dans les artères mésentériques isolées de rat IC et SHAM.

Les PDE3 et PDE4 présentent l'activité majoritaire tandis qu'aucune activité de la PDE2 n'a été détectée suggérant sa faible contribution dans l'hydrolyse de l'AMPc, au niveau vasculaire. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude réalisée dans notre équipe sur l'aorte de rat avec le même protocole (Hubert et al., 2014). Il semblerait que la PDE2 soit très faiblement exprimée au niveau vasculaire, comme le rapporte l'étude de Saeki et Saito (Saeki and Saito, 1993a) réalisée dans l'aorte porcine dépourvue d'endothélium. L'hydrolyse de l'AMPc par la PDE2 avait alors été mise en évidence par l'utilisation de forte concentration de GMPc ( $10 \mu\text{M}$ ) (Saeki and Saito, 1993a). Alors que dans nos expériences, nous avons utilisé une concentration



plus faible de GMPc (5  $\mu$ M) ce qui pourrait être insuffisant pour la mesure de l'activité de la PDE2. Comme la PDE2 hydrolyse l'AMPc et le GMPc), il semblerait intéressant, dans notre modèle, de mesurer l'activité d'hydrolyse de la PDE2 pour le GMPc, substrat pour lequel elle a légèrement plus d'affinité que l'AMPc ( $K_m$  pour le GMPc : 10-30  $\mu$ mol/L,  $K_m$  pour l'AMPc : 30-50  $\mu$ mol/L) (Omori and Kotera, 2007b).

L'étude de (Saeki and Saito, 1993b) a été l'une des rares à avoir détecté l'activité de la PDE2 dans les CMLs car cette enzyme est souvent associée à une localisation endothéliale. En effet les études de Keravis et Souness (Keravis et al., 2000; Souness et al., 1990) rapportent respectivement une forte expression de la PDE2 dans les CEs d'aorte bovine et porcine en culture. Il n'est cependant pas improbable que les conditions de cultures changent le phénotype de CEs et par conséquent impactent sur l'expression des PDEs et leur activité. Par conséquent, la réalisation d'un dosage de l'activité PDE2 de segment d'artère dépourvu d'endothélium en comparaison à des artères intactes permettrait de préciser sa localisation.

Ensuite nous avons évalué le rôle fonctionnel des PDE2, PDE3 et PDE4 dans les artères mésentériques des deux groupes SHAM et IC. L'inhibition de la PDE3 et de la PDE4 diminue la sensibilité de l'agent contractant U46619. Des effets similaires ont été observés dans l'aorte. Cependant l'effet de l'inhibition de la PDE2 n'a diminué la contraction à l'U46619 que dans les artères mésentériques sans altérer la réponse contractile de l'aorte. Ceci suggère l'existence d'une spécificité fonctionnelle de la PDE2 dans les artères mésentériques.

L'AMPc et le GMPc étant tous deux substrats pour la PDE2, nous avons ensuite évalué l'implication différentielle de cette PDE dans les voies relaxantes de ces deux nucléotides cycliques. Nos expériences ont révélé que quel que soit la nature de l'agent élévateur de la [AMPc] : isoprénaline (agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergique) ou L85 (activateur des adénylates cyclases), l'inhibition de la PDE2 ne modifie pas les réponses relaxantes dans les deux groupes SHAM et IC. A l'opposé, l'étude de Bubb (Bubb et al., 2014), réalisée dans un modèle *in vivo* d'HTAP induite chez des rats par exposition à l'hypoxie, rapporte que l'inhibition de la PDE2 potentialise la réponse vasorelaxante au treprostnil, un analogue de la prostacycline, dans l'aorte et l'artère pulmonaire des animaux en hypoxie. Ceci suggère que le rôle de la PDE2 dans la voie AMPc dépend du lit vasculaire étudié et de la pathologie qui y est associée.

L'impact de l'inhibition de la PDE2 sur la voie de signalisation du GMPc a été étudié dans deux conditions, lorsque le GMPc est produit par stimulation des GCp couplées au récepteur des peptides natriurétiques et lorsque le GMPc est produit par les GCc activées par un donneur de

NO. La PDE2 ne semble pas impliquée dans ces deux voies de signalisations quel que soit le groupe de rat, SHAM ou IC. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'étude de Bubb (Bubb et al., 2014) dans laquelle il est rapporté, par l'utilisation d'un protocole similaire à celui employé dans notre étude, que l'inhibition de la PDE2 par le BAY 60-7550 semble potentialiser préférentiellement la voie de l'ANP dans l'artère pulmonaire. Néanmoins la voie du NO est potentialisée de façon indifférenciée dans l'aorte et l'artère pulmonaire. Une explication de cette incohérence entre les deux études pourrait porter sur l'amplitude de la pré-contraction obtenue avec l'U46619 avant l'application des agents vasorelaxants. En effet, dans l'étude de Bubb, les expériences ont été conduites avec une concentration d'U46619 permettant d'obtenir 80% de la réponse contractile maximale. Or, dans notre étude, nous avons utilisé une concentration plus importante (1 $\mu$ M), correspondant à 100% de la réponse maximale (Figure 3R, p128). Ce degré de contraction plus important pourrait rendre plus difficile l'observation d'un effet éventuel du BAY.

De manière alternative, il pourrait s'avérer que le rôle fonctionnel de la PDE2 diffère d'un lit vasculaire à un autre. Dans notre modèle d'étude, l'artère mésentérique, la PDE2 semble impliquée dans la régulation de la réponse contractile, mais pas des réponses relaxantes. Ceci pourrait être dû à sa très faible expression dans ce tissu (difficilement détectable par Western blot) responsable du masquage de son activité par d'autres PDEs lorsque la production de NC est stimulée. En effet, les PDE3 et PDE4 détectées majoritairement, peuvent être impliquées dans la voie de l'AMPc alors que la PDE5, largement exprimé dans les CMLs (Rybalkin et al., 2003), interviendrait majoritairement dans l'hydrolyse du GMPc. Il apparaîtrait donc intéressant de réaliser des expériences de réactivité vasculaire en incubant les segments d'artère avec le Cil et le Ro ou le sildénafil (inhibiteur de la PDE5) en présence de BAY afin de révéler une éventuelle activité de la PDE2. Une partie des travaux du précédent doctorant a révélé que l'effet relaxant de l'inhibiteur de PDE2 était dépendant de l'activité de la NOS car abrogé en présence de L-NAME. Ce résultat plaide en faveur d'une localisation endothéliale de la PDE2 dans les artères mésentériques. Bien que cette hypothèse soit soutenue par les études de Keravis et Souness (Keravis et al., 2000; Souness et al., 1990) dans lesquelles l'activité de la PDE2 a été quantifiée dans les CEs d'aorte bovine et porcine en culture, il semblerait que l'expression endothéliale de la PDE2 dans le tissu vasculaire natif, soit restreinte aux petits vaisseaux et veines mais exclue les artères (Sadhu et al., 1999). Afin d'éclaircir cette problématique de la quantité et la localisation (endothéliale ou non) de l'expression de la PDE2 dans notre modèle d'étude, la détection des transcrits codant la PDE2 pourrait être envisagée

dans les artères mésentériques intacte et dépourvues d'endothélium fonctionnel. Ces expériences pourront être complétées par un marquage immunohistochimique sur coupes d'artères. Dans le cas où la détection de la PDE2 s'avère difficile par ces techniques, on pourrait émettre l'hypothèse que le BAY agirait sur une autre cible intracellulaire autre que la PDE2. Une autre hypothèse est que l'expression de cette PDE est peut être infime dans les artères mésentériques mais se concentre dans des espaces subcellulaires jouant un rôle clé dans la contraction.

# Conclusions

Notre étude a permis d'approfondir le mécanisme moléculaire par le quelle certaines familles de PDE régulent le tonus des artères de résistances.

L'utilisation d'un modèle intégré d'artère coronaire et mésentérique de rat a permis de souligner la complexité de cette voie de régulation. En effet, deux facteurs semblent y contribuer : l'endothélium et l'existence d'une pathologie (insuffisance cardiaque).

Nos résultats confirment le rôle majoritaire des PDE3 et PDE4 dans les artères de résistance et mettent évidence une régulation spécifique des BK<sub>Ca</sub> par ces PDEs dans l'artère coronaire.

Bien que le dosage biochimique ne reflète pas les expériences *ex-vivo*, il semblerait que le rôle fonctionnel de la PDE2, absent dans un modèle d'artère de conductance, soit restreint à l'artère mésentérique et ne soit pas altéré par l'insuffisance cardiaque.

L'utilisation d'une approche pharmacologique a permis d'évaluer le rôle des PDE3, PDE4 et PDE2 dans la régulation du tonus artérielle. Les limites de cette technique sont liées à la sélectivité des inhibiteurs utilisés. C'est pourquoi, il serait intéressant d'utiliser des modèles de souris KO pour ces PDEs afin de compléter l'étude pharmacologique.

# Bibliographie

- Abi-Gerges, A., Richter, W., Lefebvre, F., Mateo, P., Varin, A., Heymes, C., Samuel, J.-L., Lugnier, C., Conti, M., Fischmeister, R., et al. (2009). Decreased Expression and Activity of cAMP Phosphodiesterases in Cardiac Hypertrophy and Its Impact on  $\beta$ -Adrenergic cAMP Signals. *Circ. Res.* 105, 784–792.
- Aiello, E.A., Walsh, M.P., and Cole, W.C. (1995). Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 268, H926–H934.
- Aiello, E.A., Malcolm, A.T., Walsh, M.P., and Cole, W.C. (1998).  $\beta$ -Adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 275, H448–H459.
- Albarwani, S., Nemetz, L.T., Madden, J.A., Tobin, A.A., England, S.K., Pratt, P.F., and Rusch, N.J. (2003). Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. *J. Physiol.* 551, 751–763.
- Amberg, G.C., and Santana, L.F. (2003). Downregulation of the BK Channel  $\beta$ 1 Subunit in Genetic Hypertension. *Circ. Res.* 93, 965–971.
- Amberg, G.C., Bonev, A.D., Rossow, C.F., Nelson, M.T., and Santana, L.F. (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J. Clin. Invest.* 112, 717–724.
- Appleman, M.M., and Thompson, W.J. (1971). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain. *Biochemistry (Mosc.)* 10, 311–316.
- Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., and Weir, E.K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7583–7587.
- Armstrong, S., and Ganote, C.E. (1995). In vitro ischaemic preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of selective adenosine receptor blockade and calphostin C. *Cardiovasc. Res.* 29, 647–652.
- Asano, S., Bratz, I.N., Berwick, Z.C., Fancher, I.S., Tune, J.D., and Dick, G.M. (2012). Penitrem A as a Tool for Understanding the Role of Large Conductance Ca<sup>2+</sup>/Voltage-Sensitive K<sup>+</sup> Channels in Vascular Function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342, 453–460.
- Aubel, R.A.M.H. van, Smeets, P.H.E., Peters, J.G.P., Bindels, R.J.M., and Russel, F.G.M. (2002). The MRP4/ABCC4 Gene Encodes a Novel Apical Organic Anion Transporter in Human Kidney Proximal Tubules: Putative Efflux Pump for Urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 595–603.
- Bachetti, T., and Morbidelli, L. (2000). Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol. Res.* 42, 9–19.
- Bagnall, A.J., Kelland, N.F., Gulliver-Sloan, F., Davenport, A.P., Gray, G.A., Yanagisawa, M., Webb, D.J., and Kotelevtsev, Y.V. (2006). Deletion of Endothelial Cell Endothelin B Receptors Does Not Affect Blood Pressure or Sensitivity to Salt. *Hypertension* 48, 286–293.

- Balligand, J.-L. (1999). Regulation of cardiac  $\beta$ -adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc. Res.* 43, 607–620.
- Bardou, M., Goirand, F., Bernard, A., Guerard, P., Gatinet, M., Devillier, P., Dumas, J.-P., Morcillo, E.J., Rochette, L., and Dumas, M. (2002). Relaxant effects of selective phosphodiesterase inhibitors on U46619 precontracted human intralobar pulmonary arteries and role of potassium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40, 153–161.
- Barman, S.A., Zhu, S., Han, G., and White, R.E. (2003). cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L1004–L1011.
- Barst, R.J., Rubin, L.J., McGoon, M.D., Caldwell, E.J., Long, W.A., and Levy, P.S. (1994). Survival in primary pulmonary hypertension with long-term continuous intravenous prostacyclin. *Ann. Intern. Med.* 121, 409–415.
- Bauersachs, J., Bouloumié, A., Fraccarollo, D., Hu, K., Busse, R., and Ertl, G. (1999). Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression. *Circulation* 100, 292–298.
- Bauersachs, J., Heck, M., Fraccarollo, D., Hildemann, S.K., Ertl, G., Wehling, M., and Christ, M. (2002). Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: Role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 351–358.
- Bayliss, W.M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol.* 28, 220.
- Beavo, J.A., Hardman, J.G., and Sutherland, E.W. (1971). Stimulation of Adenosine 3',5'-Monophosphate Hydrolysis by Guanosine 3',5'-Monophosphate. *J. Biol. Chem.* 246, 3841–3846.
- Beavo, J.A., Francis, S.H., and Houslay, M.D. (2006). *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease* (CRC Press).
- Begonha, R., Moura, D., and Guimarães, S. (1995). Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 510–513.
- Begum, N., Hockman, S., and Manganiello, V.C. (2011). Phosphodiesterase 3A (PDE3A) Deletion Suppresses Proliferation of Cultured Murine Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) via Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Signaling and Alterations in Critical Cell Cycle Regulatory Proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 26238–26249.
- Belardinelli, L., Linden, J., and Berne, R.M. (1989). The cardiac effects of adenosine. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 32, 73–97.
- Belardinelli, L., Shryock, J.C., Snowdy, S., Zhang, Y., Monopoli, A., Lozza, G., Ongini, E., Olsson, R.A., and Dennis, D.M. (1998). The A2A Adenosine Receptor Mediates Coronary Vasodilation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 1066–1073.
- Bender, A.T., and Beavo, J.A. (2006). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacol. Rev.* 58, 488–520.



- Berg, T. (2003). The vascular response to the K<sup>+</sup> channel inhibitor 4-aminopyridine in hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 466, 301–310.
- Berne, R.M. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol. Content* 204, 317–322.
- Bilmen, J.G., Wootton, L.L., and Michelangeli, F. (2002). The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase by paxilline. *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 55–64.
- Blease, K., Burke-Gaffney, A., and Hellewell, P.G. (1998). Modulation of cell adhesion molecule expression and function on human lung microvascular endothelial cells by inhibition of phosphodiesterases 3 and 4. *Br. J. Pharmacol.* 124, 229–237.
- Boess, F.G., Hendrix, M., van der Staay, F.-J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A., and Koenig, G. (2004). Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47, 1081–1092.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., and Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850–853.
- Bolton, T.B., and Imaizumi, Y. (1996). Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells. *Cell Calcium* 20, 141–152.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (1999). The multidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1461, 347–357.
- Bos, J.L. (2006). Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem. Sci.* 31, 680–686.
- Brandl, C.J., Martin, D.R., MacLennan, D.H., and others (1987). Adult forms of the Ca<sup>2+</sup> ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262, 3768–3774.
- Brawley, L., Shaw, A.M., and MacDonald, A. (2000). Role of endothelium/nitric oxide in atypical  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 398, 285–296.
- Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (1992). Regulation of Arterial Tone by Activation of Calcium-Dependent Potassium Channels. *Science* 256, 532–535.
- Brenner, R., Pérez, G.J., Bonev, A.D., Eckman, D.M., Kosek, J.C., Wiler, S.W., Patterson, A.J., Nelson, M.T., and Aldrich, R.W. (2000). Vasoregulation by the  $\beta$ 1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870–876.
- Brion, R., Chevalier, L., Doutreleau, S., Gauthier, J., Guy, J.-M., Kervio, G., Lafay, V., Laporte, T., Paulin, P., Verdier, J.-C., et al. (2013). *Cardiologie du sport* (De Boeck Supérieur).
- Bristow, M.R. (1993). Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22, A61–A71.

- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R., Zera, P., Menlove, R., Shah, P., and Jamieson, S. (1986). Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* 59, 297–309.
- Bristow, M.R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R.S., Sageman, W.S., Lurie, K., Billingham, M.E., Harrison, D.C., and Stinson, E.B. (2010). Decreased Catecholamine Sensitivity and  $\beta$ -Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts.
- Brown, I.P., Thompson, C.I., and Belloni, F.L. (1993). Role of nitric oxide in hypoxic coronary vasodilatation in isolated perfused guinea pig heart. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 264, H821–H829.
- Brown, S.M., Bentcheva-Petkova, L.M., Liu, L., Hristov, K.L., Chen, M., Kellett, W.F., Meredith, A.L., Aldrich, R.W., Nelson, M.T., and Petkov, G.V. (2008).  $\beta$ -Adrenergic relaxation of mouse urinary bladder smooth muscle in the absence of large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 295, F1149–F1157.
- Bruno, O., Fedele, E., Prickaerts, J., Parker, L., Canepa, E., Brullo, C., Cavallero, A., Gardella, E., Balbi, A., Domenicotti, C., et al. (2011). GEBR-7b, a novel PDE4D selective inhibitor that improves memory in rodents at non-emetic doses. *Br. J. Pharmacol.* 164, 2054–2063.
- Bubb, K.J., Trinder, S.L., Baliga, R.S., Patel, J., Clapp, L.H., MacAllister, R.J., and Hobbs, A.J. (2014). Inhibition of Phosphodiesterase 2 Augments cGMP and cAMP Signaling to Ameliorate Pulmonary Hypertension. *Circulation* 130, 496–507.
- Burk, S.E., Lytton, J., MacLennan, D.H., and Shull, G.E. (1989). cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *J. Biol. Chem.* 264, 18561–18568.
- Burnstock, G. (2011). Cholinergic and Purinergic Regulation of Blood Vessels. In *Comprehensive Physiology*, (John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Burnstock, G., and Iwayama, T. (1971). Fine-structural Identification of Autonomic Nerves and their Relation to Smooth Muscle. *Prog. Brain Res.* 34, 389–404.
- Busse, R., Förstermann, U., Matsuda, H., and Pohl, U. (1984). The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 401, 77–83.
- Busse, R., Edwards, G., Féletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M., and Weston, A.H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 374–380.
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D.P., Wei, A., and Salkoff, L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding “maxi” calcium-activated potassium channels. *Science* 261, 221–224.
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., and Trendelenburg, U. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 121–136.

- Camacho, P., Fan, H., Liu, Z., and He, J.-Q. (2016). Small mammalian animal models of heart disease. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 6, 70.
- Campbell, J.D., Sansom, M.S.P., and Ashcroft, F.M. (2003). Potassium channel regulation. *EMBO Rep.* 4, 1038–1042.
- Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F., and Harder, D.R. (1996). Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* 78, 415–423.
- Carafoli, E. (1992). The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267, 2115–2118.
- Carrier, G.O., Fuchs, L.C., Winecoff, A.P., Giulumian, A.D., and White, R.E. (1997). Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 273, H76–H84.
- Cecchi, F., Olivotto, I., Gistri, R., Lorenzoni, R., Chiriatti, G., and Camici, P.G. (2003). Coronary Microvascular Dysfunction and Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 349, 1027–1035.
- Chambers, R.J., Abrams, K., Garceau, N.Y., Kamath, A.V., Manley, C.M., Lilley, S.C., Otte, D.A., Scott, D.O., Sheils, A.L., Tess, D.A., et al. (2006). A new chemical tool for exploring the physiological function of the PDE2 isozyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 307–310.
- Chan, H., Yao, X., Tsang, S., Bourreau, B., Chan, F., and Huang, Y. (2002). Role of Endothelium/Nitric Oxide and Cyclic AMP in Isoproterenol Potentiation of 17 $\beta$ -Estradiol-Mediated Vasorelaxation. *J. Card. Surg.* 17, 562–562.
- Chapman, R.A., and Tunstall, J. (1987). The calcium paradox of the heart. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 50, 67–96.
- Charney, R., and Cohen, M. (1993). The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am. Heart J.* 126, 937–945.
- Chassot, P.-G., BETTEX, D.A., and BOEGLI, Y. (2010). PAC - Précis d'anesthésie cardiaque.
- Chen, M., Li, J., Jiang, F., Fu, J., Xia, X., Du, J., Hu, M., Huang, J., and Shen, B. (2016). Orai1 forms a signal complex with BKCa channel in mesenteric artery smooth muscle cells. *Physiol. Rep.* 4, e12682.
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., and Buck, J. (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor. *Science* 289, 625–628.
- Chen, Z.-P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., and Kemp, B.E. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443, 285–289.
- Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium *sparks*: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740–744.

- Clément-Chomienne, O., Walsh, M.P., and Cole, W.C. (1996). Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular myocytes. *J. Physiol.* 495, 689–700.
- Conti, M., and Beavo, J. (2007). Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 481–511.
- Cornwell, T.L., Pryzwansky, K.B., Wyatt, T.A., and Lincoln, T.M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 40, 923–931.
- Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C., and Harrison, D.G. (1996). Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. *Circ. Res.* 79, 984–991.
- Cox, R.H. (2005). Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. *Cell Biochem. Biophys.* 42, 167–195.
- Cullere, X., Shaw, S.K., Andersson, L., Hirahashi, J., Lusinskas, F.W., and Mayadas, T.N. (2005). Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* 105, 1950–1955.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1997). Switching of the coupling of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88–91.
- Daff, S. (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide* 23, 1–11.
- Dandona, P. (2002). Endothelium, inflammation, and diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2, 311–315.
- Dart, C., and Standen, N.B. (1993). Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J. Physiol.* 471, 767–786.
- Daut, J., Maier-Rudolph, W., Beckerath, N. von, Mehrke, G., Gunther, K., and Goedel-Meinen, L. (1990). Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 247, 1341–1344.
- Davis, M.E., Cai, H., Drummond, G.R., and Harrison, D.G. (2001). Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Through c-Src by Divergent Signaling Pathways. *Circ. Res.* 89, 1073–1080.
- Davis, M.J., Donovitz, J.A., and Hood, J.D. (1992). Stretch-activated single-channel and whole cell currents in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 262, C1083–C1088.
- DeFouw, L.M., and DeFouw, D.O. (2001). Differential Phosphodiesterase Activity Contributes to Restrictive Endothelial Barrier Function during Angiogenesis. *Microvasc. Res.* 62, 263–270.
- Deussen, A., Ohanyan, V., Jannasch, A., Yin, L., and Chilian, W. (2012). Mechanisms of metabolic coronary flow regulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 794–801.

- Di Benedetto, G., Scalzotto, E., Mongillo, M., and Pozzan, T. (2013). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Uptake Induces Cyclic AMP Generation in the Matrix and Modulates Organelle ATP Levels. *Cell Metab.* *17*, 965–975.
- Diebold, I., Djordjevic, T., Petry, A., Hatzelmann, A., Tenor, H., Hess, J., and Görlach, A. (2009). Phosphodiesterase 2 Mediates Redox-Sensitive Endothelial Cell Proliferation and Angiogenesis by Thrombin via Rac1 and NADPH Oxidase 2. *Circ. Res.* *104*, 1169–1177.
- Dimitropoulou, C., Han, G., Miller, A.W., Molero, M., Fuchs, L.C., White, R.E., and Carrier, G.O. (2002). Potassium (BKCa) currents are reduced in microvascular smooth muscle cells from insulin-resistant rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *282*, H908–H917.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* *399*, 601–605.
- Ding, B., Abe, J., Wei, H., Huang, Q., Walsh, R.A., Molina, C.A., Zhao, A., Sadoshima, J., Blaxall, B.C., Berk, B.C., et al. (2005). Functional Role of Phosphodiesterase 3 in Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation* *111*, 2469–2476.
- Dong, L., Zheng, Y.-M., Van Riper, D., Rathore, R., Liu, Q.-H., Singer, H.A., and Wang, Y.-X. (2008). Functional and Molecular Evidence for Impairment of Calcium-Activated Potassium Channels in Type-1 Diabetic Cerebral Artery Smooth Muscle Cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 377–386.
- Dunkern, T.R., and Hatzelmann, A. (2005). The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. *Cell. Signal.* *17*, 331–339.
- Earley, S., Waldron, B.J., and Brayden, J.E. (2004). Critical Role for Transient Receptor Potential Channel TRPM4 in Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Circ. Res.* *95*, 922–929.
- Eckly, A.E., and Lugnier, C. (1994). Role of phosphodiesterases III and IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.* *113*, 445.
- Eckly, A.E., Stoclet, J.-C., and Lugnier, C. (1994). Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* *271*, 237–240.
- Eckly-Michel, A., Martin, V., and Lugnier, C. (1997). Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation. *Br. J. Pharmacol.* *122*, 158–164.
- Edvinsson, L., and Owman, C. (1974). Pharmacological Characterization of Adrenergic Alpha and Beta Receptors Mediating the Vasomotor Responses of Cerebral Arteries *In Vitro*. *Circ. Res.* *35*, 835–849.
- Edwards, G., Niederste-Hollenberg, A., Schneider, J., Noack, T., and Weston, A.H. (1994). Ion channel modulation by NS 1619, the putative BKCa channel opener, in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* *113*, 1538–1547.

- Eglen, R.M., Hegde, S.S., and Watson, N. (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 48, 531–565.
- Eisner, D.A., and Lederer, W.J. (1985). Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 248, C189–C202.
- Elayda, M.A., Mathur, V.S., Hall, R.J., Massumi, G.A., Garcia, E., and de Castro, C.M. (1985). Collateral circulation in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 55, 58–60.
- Erga, K.S., Seubert, C.N., Liang, H.-X., Wu, L., Shryock, J.C., and Belardinelli, L. (2000). Role of A2A-adenosine receptor activation for ATP-mediated coronary vasodilation in guinea-pig isolated heart. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1065–1075.
- Fang, Z.Y., and Marwick, T.H. (2002). Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? *Am. Heart J.* 143, 383–390.
- Fantozzi, D.A., Harootunian, A.T., Wen, W., Taylor, S.S., Feramisco, J.R., Tsien, R.Y., and Meinkoth, J.L. (1994). Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J. Biol. Chem.* 269, 2676–2686.
- Favot\*, L., Keravis\*, T., and Lugnier, C. (2004). Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb. Haemost.* 92, 634–645.
- Feigl, E.O. (1983). Coronary physiology. *Physiol. Rev.* 63, 1–205.
- Feldman, R.D., and Gros, R. (2010). Rapid vascular effects of steroids - a question of balance? *Can. J. Cardiol.* 26 Suppl A, 22A–26A.
- Feldman, A.M., Weinberg, E.O., Ray, P.E., and Lorell, B.H. (1993). Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ. Res.* 73, 184–192.
- Félétou, M. (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br. J. Pharmacol.* 156, 545–562.
- Félétou, M., and Vanhoutte, P.M. (2007). Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Ann. Med.* 39, 495–516.
- Félétou, M., Köhler, R., and Vanhoutte, P.M. (2012). Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann. Med.* 44, 694–716.
- Fernández-Fernández, J.M., Tomás, M., Vázquez, E., Orio, P., Latorre, R., Sentí, M., Marrugat, J., and Valverde, M.A. (2004). Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J. Clin. Invest.* 113, 1032–1039.
- Ferro, A., Coash, M., Yamamoto, T., Rob, J., Ji, Y., and Queen, L. (2004). Nitric oxide-dependent  $\beta$ 2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br. J. Pharmacol.* 143, 397–403.

- Fleming, I. (2016). The factor in EDHF: Cytochrome P450 derived lipid mediators and vascular signaling. *Vascul. Pharmacol.* 86, 31–40.
- Francis, S.H., Busch, J.L., and Corbin, J.D. (2010). cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacol. Rev.* 62, 525–563.
- Franzin-Garrec, M. (2013). [Heart failure. A chronic disease with an alarming increase]. *Soins Rev. Ref. Infirm.* 25.
- Freissmuth, M., Schütz, W., and Linder, M.E. (1991). Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3. *J. Biol. Chem.* 266, 17778–17783.
- Fu, X., Gong, M.C., Jia, T., Somlyo, A.V., and Somlyo, A.P. (1998). The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPγS-, and phorbol ester-induced Ca<sup>2+</sup>-sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett.* 440, 183–187.
- Fukata, Y., Kaibuchi, K., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 32–39.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., and others (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., De Ckhashtonay, C., Vandekerckhove, J., Weber, K., and Franke, W.W. (1981). Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 298–302.
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* 265, 11083–11090.
- Garcia-Valdes, J., Zamudio, F.Z., Toro, L., and Possan, L.D. (2001). Slotoxin, αKTx1. 11, a new scorpion peptide blocker of MaxiK channels that differentiates between α and α+ β (β1 or β4) complexes. *FEBS Lett.* 505, 369–373.
- Garland, C.J., and Dora, K.A. (2017). EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 219, 152–161.
- Gebremedhin, D., Ma, Y.H., Falck, J.R., Roman, R.J., VanRollins, M., and Harder, D.R. (1992). Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 263, H519–H525.
- Gebremedhin, D., Yamaura, K., and Harder, D.R. (2008). Role of 20-HETE in the hypoxia-induced activation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel currents in rat cerebral arterial muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H107–120.
- Ghaleh, B., Béa, M.-L., Dubois-Randé, J.-L., Giudicelli, J.-F., Hittinger, L., and Berdeaux, A. (1995). Endothelial Modulation of β-Adrenergic Dilation of Large Coronary Arteries in Conscious Dogs. *Circulation* 92, 2627–2635.

Ghosh, D., Syed, A.U., Prada, M.P., Nystoriak, M.A., Santana, L.F., Nieves-Cintrón, M., and Navedo, M.F. (2017). Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 78, 49–87.

Giangiacomo, K.M., Garcia, M.L., and McManus, O.B. (1992). Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 6719–6727.

Gimenez-Gallego, G., Navia, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1988). Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 3329.

Goldstein, S.A., and Miller, C. (1993). Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* 65, 1613.

Gong, M.C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A.V., and Somlyo, A.P. (1992). Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J. Biol. Chem.* 267, 21492–21498.

Gray, D.W., and Marshall, I. (1992). Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent  $\beta$ -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* 107, 684–690.

Grifoni, S.C., Chiposi, R., McKey, S.E., Ryan, M.J., and Drummond, H.A. (2010). Altered whole kidney blood flow autoregulation in a mouse model of reduced  $\beta$ -ENaC. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 298, F285–F292.

Grimm, P.R., Irsik, D.L., Settles, D.C., Holtzclaw, J.D., and Sansom, S.C. (2009). Hypertension of *Kcnmb1*<sup>−/−</sup> is linked to deficient K secretion and aldosteronism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 11800–11805.

Gros, R., Uum, S.V., Hutchinson-Jaffe, A., Ding, Q., Pickering, J.G., Hegele, R.A., and Feldman, R.D. (2007). Increased Enzyme Activity and  $\beta$ -Adrenergic-Mediated Vasodilation in Subjects Expressing a Single-Nucleotide Variant of Human Adenylyl Cyclase 6. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2657–2663.

Gueguen, M., Keuylian, Z., Mateo, V., Mougenot, N., Lompré, A.-M., Michel, J.-B., Meilhac, O., Lipskaia, L., and Limon, I. (2010). Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling. *J. Pathol.* 221, 331–342.

Guia, A., Wan, X., Courtemanche, M., and Leblanc, N. (1999). Local Ca<sup>2+</sup> Entry Through L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Activates Ca<sup>2+</sup>-Dependent K<sup>+</sup> Channels in Rabbit Coronary Myocytes. *Circ. Res.* 84, 1032–1042.

Guimarães, S., and Moura, D. (2001). Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacol. Rev.* 53, 319–356.

Haddy, F.J., Vanhoutte, P.M., and Feletou, M. (2006). Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R546–R552.



- Hadley, J.K., Noda, M., Selyanko, A.A., Wood, I.C., Abogadie, F.C., and Brown, D.A. (2000). Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 129, 413–415.
- Hamasaki, S., Al Suwaidi, J., Higano, S.T., Miyauchi, K., Holmes Jr., D.R., and Lerman, A. (2000). Attenuated coronary flow reserve and vascular remodeling in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 1654–1660.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.
- Han, G., Kryman, J.P., Mcmillin, P.J., White, R.E., and Carrier, G.O. (1999). A novel transduction mechanism mediating dopamine-induced vascular relaxation: opening of Bkca channels by cyclic Amp-induced stimulation of the cyclic Gmp-dependent protein kinase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 619–627.
- Hansson, G.K., Geng, Y.J., Holm, J., Hårdhammar, P., Wennmalm, A., and Jennische, E. (1994). Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J. Exp. Med.* 180, 733–738.
- Hare, J.M., Givertz, M.M., Creager, M.A., and Colucci, W.S. (1998). Increased Sensitivity to Nitric Oxide Synthase Inhibition in Patients With Heart Failure. *Circulation* 97, 161–166.
- Harrison, D.G., Widder, J., Grumbach, I., Chen, W., Weber, M., and Searles, C. (2006a). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J. Intern. Med.* 259, 351–363.
- Harrison, D.G., Widder, J., Grumbach, I., Chen, W., Weber, M., and Searles, C. (2006b). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J. Intern. Med.* 259, 351–363.
- Harteneck, C., Koesling, D., Söling, A., Schultz, G., and Böhme, E. (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. *FEBS Lett.* 272, 221–223.
- Hathaway, D.R., Konicki, M.V., and Coolican, S.A. (1985). Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, 841–850.
- Hayabuchi, Y., Nakaya, Y., Matsuoka, S., and Kuroda, Y. (1998). Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Heart Vessels* 13, 9–17.
- Hayabuchi, Y., Standen, N.B., and Davies, N.W. (2001). Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K<sup>+</sup> channels of rat arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 281, H2480–H2489.
- Haynes, J., Killilea, D.W., Peterson, P.D., and Thompson, W.J. (1996). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic-39,59-guanosine monophosphate-stimulated phosphodiesterase to reverse hypoxic pulmonary vasoconstriction in the perfused rat lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 752–757.

- He, R., Komasa, N., Ekholm, D., Murata, T., Taira, M., Hockman, S., Degerman, E., and Manganiello, V.C. (1998). Expression and characterization of deletion recombinants of two cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3). *Cell Biochem. Biophys.* 29, 89–111.
- Heikaus, C.C., Pandit, J., and Klevit, R.E. (2009). Cyclic Nucleotide Binding GAF Domains from Phosphodiesterases: Structural and Mechanistic Insights. *Structure* 17, 1551–1557.
- Hein, T.W., and Kuo, L. (1999). cAMP-Independent Dilation of Coronary Arterioles to Adenosine. *Circ. Res.* 85, 634–642.
- Hickey, K.A., Rubanyi, G., Paul, R.J., and Highsmith, R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 248, C550–C556.
- Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., and Iino, M. (1999). Spatiotemporal Dynamics of Inositol 1,4,5-Trisphosphate That Underlies Complex Ca<sup>2+</sup> Mobilization Patterns. *Science* 284, 1527–1530.
- Hirst, G.D., and Edwards, F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol. Rev.* 69, 546–604.
- Hofmann, F., Bernhard, D., Lukowski, R., and Weinmeister, P. (2009). cGMP Regulated Protein Kinases (cGK). In *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications*, H.H.H.W. Schmidt, F. Hofmann, and J.-P. Stasch, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 137–162.
- Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., and Morgan, K.G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 76, 967–1003.
- Hou, S., Xu, R., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2008a). The RCK1 high-affinity Ca<sup>2+</sup> sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4039–4043.
- Hou, S., Xu, R., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2008b). Reciprocal regulation of the Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> sensitivity in the SLO1 BK channel conferred by the RCK1 domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 403–410.
- Houslay, M.D., Schafer, P., and Zhang, K.Y.J. (2005). Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov. Today* 10, 1503–1519.
- Houslay, M.D., Baillie, G.S., and Maurice, D.H. (2007). cAMP-Specific Phosphodiesterase-4 Enzymes in the Cardiovascular System A Molecular Toolbox for Generating Compartmentalized cAMP Signaling. *Circ. Res.* 100, 950–966.
- Hu, X.-Q., and Zhang, L. (2012). Function and regulation of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov. Today* 17, 974–987.
- Hubert, F., Belacel-Ouari, M., Manoury, B., Zhai, K., Domergue-Dupont, V., Mateo, P., Joubert, F., Fischmeister, R., and Leblais, V. (2014). Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br. J. Pharmacol.* 171, 5361–5375.

- Ikebe, M., Hartshorne, D.J., and Elzinga, M. (1987). Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 262, 9569–9573.
- Indolfi, C., Avvedimento, E.V., Di Lorenzo, E., Esposito, G., Rapacciuolo, A., Giuliano, P., Grieco, D., Cavuto, L., Stingone, A.M., Ciullo, I., et al. (1997). Activation of cAMP–PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat. Med.* 3, 775–779.
- Ishizaka, H., Gudi, S.R., Frangos, J.A., and Kuo, L. (1999). Coronary Arteriolar Dilation to Acidosis. *Circulation* 99, 558–563.
- Jackson, W.F. (2000). Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension* 35, 173–178.
- Janiak, R., Wilson, S.M., Montague, S., and Hume, J.R. (2001). Heterogeneity of calcium stores and elementary release events in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 280, C22–C33.
- Jedlitschky, G., Burchell, B., and Keppler, D. (2000). The Multidrug Resistance Protein 5 Functions as an ATP-dependent Export Pump for Cyclic Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 275, 30069–30074.
- Jenner, T.L., and Rose’Meyer, R.B. (2006). Adenosine A3 receptor mediated coronary vasodilation in the rat heart: Changes that occur with maturation. *Mech. Ageing Dev.* 127, 264–273.
- Jernigan, N.L., and Drummond, H.A. (2005). Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 289, F891–F901.
- Jernigan, N.L., and Drummond, H.A. (2006). Myogenic vasoconstriction in mouse renal interlobar arteries: role of endogenous  $\beta$  and  $\gamma$ ENaC. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 291, F1184–F1191.
- Jonas, E.A., and Kaczmarek, L.K. (1996). Regulation of potassium channels by protein kinases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 318–323.
- Joubert, F., Wilding, J.R., Fortin, D., Domergue-Dupont, V., Novotova, M., Ventura-Clapier, R., and Veksler, V. (2008). Local energetic regulation of sarcoplasmic and myosin ATPase is differently impaired in rats with heart failure. *J. Physiol.* 586, 5181.
- K. K. Wu, M.D., and P. Thiagarajan, M.D. (1996). Role of Endothelium in Thrombosis and Hemostasis. *Annu. Rev. Med.* 47, 315–331.
- Kalsner, S. (1977). The effect of hypoxia on prostaglandin output and on tone in isolated coronary arteries. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 882–887.
- Kamata, K., Miyata, N., and Kasuya, Y. (1989). Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 890–894.

- Kanatsuka, H., Sekiguchi, N., Sato, K., Akai, K., Wang, Y., Komaru, T., Ashikawa, K., and Takishima, T. (1992). Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ. Res.* 71, 912–922.
- Kaneda, T., Kubota, T., Fujimoto, K., Urakawa, N., Nakajyo, S., and Shimizu, K. (2010). Effects of rolipram on U46619-induced contraction and cyclic nucleotide content in the porcine coronary artery. *J. Smooth Muscle Res.* 46, 17–29.
- Kanlop, N., Chattipakorn, S., and Chattipakorn, N. (2011). Effects of cilostazol in the heart. *J. Cardiovasc. Med. Hagerstown Md* 12, 88–95.
- Kawasaki, H., Takasaki, K., Saito, A., and Goto, K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature* 335, 164–167.
- Kawasaki, H., Nuki, C., Saito, A., and Takasaki, K. (1990). Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 403–409.
- Keravis, T., Komas, N., and Lugnier, C. (2000). Cyclic Nucleotide Hydrolysis in Bovine Aortic Endothelial Cells in Culture: Differential Regulation in Cobblestone and Spindle Phenotypes. *J. Vasc. Res.* 37, 235–249.
- Kim, J.-Y., and Park, C.-S. (2008). Potentiation of large-conductance calcium-activated potassium (BKCa) channels by a specific isoform of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 459–465.
- Kim, D., Rybalkin, S.D., Pi, X., Wang, Y., Zhang, C., Munzel, T., Beavo, J.A., Berk, B.C., and Yan, C. (2001). Upregulation of Phosphodiesterase 1A1 Expression Is Associated With the Development of Nitrate Tolerance. *Circulation* 104, 2338–2343.
- Kim, M.Y., Liang, G.H., Kim, J.A., Park, S.H., Hah, J.S., and Suh, S.H. (2005). Contribution of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump and K<sub>IR</sub> currents to extracellular pH-dependent changes of contractility in rat superior mesenteric artery. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 289, H792–H800.
- Kim, N., Chung, J., Kim, E., and Han, J. (2003). Changes in the Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels of the Coronary Artery During Left Ventricular Hypertrophy. *Circ. Res.* 93, 541–547.
- Kingsbury, M.P., Turner, M.A., Flores, N.A., Bovill, E., and Sheridan, D.J. (2000). Endogenous and Exogenous Coronary Vasodilatation are Attenuated in Cardiac Hypertrophy: a Morphological Defect? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 527–538.
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T.P., and Khalequzzaman, M. (2003). Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca<sup>2+</sup> Sensitization in Rabbit Smooth Muscle. *J. Physiol.* 546, 879–889.
- Kiuchi, K., Sato, N., Shannon, R.P., Vatner, D.E., Morgan, K., and Vatner, S.F. (1993). Depressed beta-adrenergic receptor- and endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs with heart failure. *Circ. Res.* 73, 1013–1023.
- Koch, W.J., and Rockman, H.A. (1999). Exploring the Role of the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase in Cardiac Disease Using Gene-Targeted Mice. *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 77–81.

- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G., and Böhme, E. (1990). The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.* 266, 128–132.
- Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization. *Mol. Pharmacol.* 63, 9–18.
- Komas, N., Lugnier, C., and Stoclet, J.C. (1991). Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 104, 495.
- Konishi, M., and Su, C. (1983). Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5, 881–886.
- Kopperud, R., Krakstad, C., Selheim, F., and Døskeland, S.O. (2003). cAMP effector mechanisms. Novel twists for an “old” signaling system. *FEBS Lett.* 546, 121–126.
- Kozłowska, H., Szyska, U., Schlicker, E., and Malinowska, B. (2003). Atypical  $\beta$ -adrenoceptors, different from  $\beta_3$ -adrenoceptors and probably from the low-affinity state of  $\beta_1$ -adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 140, 3–12.
- Krumenacker, J.S., Hyder, S.M., and Murad, F. (2001). Estradiol rapidly inhibits soluble guanylyl cyclase expression in rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 717–722.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R., and Gilman, A.G. (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244, 1558–1564.
- Kubo, M., Nakaya, Y., Matsuoka, S., Saito, K., and Kuroda, Y. (1994). Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74, 471–476.
- Kuhn, M. (2003). Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. *Circ. Res.* 93, 700–709.
- Kwan, H.-Y., Shen, B., Ma, X., Kwok, Y.-C., Huang, Y., Man, Y.-B., Yu, S., and Yao, X. (2009). TRPC1 Associates With BKCa Channel to Form a Signal Complex in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 104, 670–678.
- Lafontan, M. (1994). Differential recruitment and differential regulation by physiological amines of fat cell  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 and  $\beta$ -3 adrenergic receptors expressed in native fat cells and in transfected cell lines. *Cell. Signal.* 6, 363–392.
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Dikalov, S., Tatge, H., Wilke, R., Kohler, C., Harrison, D.G., Hornig, B., and Drexler, H. (2002). Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 106, 3073–3078.
- Lange, A., Gebremedhin, D., Narayanan, J., and Harder, D. (1997). 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid-induced Vasoconstriction and Inhibition of Potassium Current in Cerebral Vascular Smooth Muscle Is Dependent on Activation of Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 272, 27345–27352.

- Latorre, R., Castillo, K., Carrasquel-Ursulaez, W., Sepulveda, R.V., Gonzalez-Nilo, F., Gonzalez, C., and Alvarez, O. (2017). Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol. Rev.* 97, 39–87.
- Lawson, K. (2000). Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int.* 57, 838–845.
- Ledoux, J., Werner, M.E., Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (2006). Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* 21, 69–78.
- Lefroy, D.C., Crake, T., Uren, N.G., Davies, G.J., and Maseri, A. (1993). Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation* 88, 43–54.
- Lehnart, S.E., Wehrens, X.H.T., Reiken, S., Warrier, S., Belevych, A.E., Harvey, R.D., Richter, W., Jin, S.-L.C., Conti, M., and Marks, A.R. (2005). Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. *Cell* 123, 25–35.
- Lerman, A., and Zeiher, A.M. (2005). Endothelial Function. *Circulation* 111, 363–368.
- Leroy, J., Richter, W., Mika, D., Castro, L.R.V., Abi-Gerges, A., Xie, M., Scheitrum, C., Lefebvre, F., Schittl, J., Mateo, P., et al. (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel complex regulates  $\text{Ca}^{2+}$  current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 2651–2661.
- Li, H., Hong, D.H., Son, Y.K., Na, S.H., Jung, W.-K., Bae, Y.M., Seo, E.Y., Kim, S.J., Choi, I.-W., and Park, W.S. (2015). Cilostazol induces vasodilation through the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in aortic smooth muscle. *Vascul. Pharmacol.* 70, 15–22.
- Li, M., Tanaka, Y., Alioua, A., Wu, Y., Lu, R., Kundu, P., Sanchez-Pastor, E., Marijic, J., Stefani, E., and Toro, L. (2010). Thromboxane A<sub>2</sub> receptor and MaxiK-channel intimate interaction supports channel trans-inhibition independent of G-protein activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 19096–19101.
- Lin, M.I., Fulton, D., Babbitt, R., Fleming, I., Busse, R., Pritchard, K.A., and Sessa, W.C. (2003). Phosphorylation of Threonine 497 in Endothelial Nitric-oxide Synthase Coordinates the Coupling of l-Arginine Metabolism to Efficient Nitric Oxide Production. *J. Biol. Chem.* 278, 44719–44726.
- Lincoln, T.M., and Cornwell, T.L. (1991). Towards an Understanding of the Mechanism of Action of Cyclic AMP and Cyclic GMP in Smooth Muscle Relaxation. *J. Vasc. Res.* 28, 129–137.
- Lindgren, S., and Andersson, K.-E. (1991a). Comparison of the effects of milrinone and OPC 3911 with those of isoprenaline, forskolin and dibutyryl-cAMP in rat aorta. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 22, 617–624.
- Lindgren, S., and Andersson, K.-E. (1991b). Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on isolated coronary, lung and renal arteries from man and rat. *Acta Physiol. Scand.* 142, 77–82.

- Lindgren, S., Andersson, K.-E., Belfrage, P., Degerman, E., and Manganiello, V.C. (1989). Relaxant Effects of the Selective Phosphodiesterase Inhibitors Milrinone and OPC 3911 on Isolated Human Mesenteric Vessels. *Pharmacol. Toxicol.* 64, 440–445.
- Lindgren, S., Rascón, A., Andersson, K.-E., Manganiello, V., and Degerman, E. (1991a). Selective inhibition of cGMP-inhibited and cGMP-noninhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases and relaxation of rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* 42, 545–552.
- Lindgren, S., Rascón, A., Andersson, K.-E., Manganiello, V., and Degerman, E. (1991b). Selective inhibition of cGMP-inhibited and cGMP-noninhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases and relaxation of rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* 42, 545–552.
- Lindgren, S.H.S., Andersson, T.L.G., Vinge, E., and Andersson, K.-E. (1990). Effects of isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors on rat aorta and human platelets: smooth muscle tone, platelet aggregation and cAMP levels. *Acta Physiol. Scand.* 140, 209–219.
- Liu, H., and Maurice, D.H. (1998). Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: Differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1501–1510.
- Liu, G., Shi, J., Yang, L., Cao, L., Park, S.M., Cui, J., and Marx, S.O. (2004a). Assembly of a Ca<sup>2+</sup>-dependent BK channel signaling complex by binding to beta2 adrenergic receptor. *EMBO J.* 23, 2196–2205.
- Liu, G., Shi, J., Yang, L., Cao, L., Park, S.M., Cui, J., and Marx, S.O. (2004b). Assembly of a Ca<sup>2+</sup>-dependent BK channel signaling complex by binding to  $\beta$ 2 adrenergic receptor. *EMBO J.* 23, 2196–2205.
- Liu, G., Zakharov, S.I., Yang, L., Wu, R.S., Deng, S.-X., Landry, D.W., Karlin, A., and Marx, S.O. (2008). Locations of the  $\beta$ 1 transmembrane helices in the BK potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 10727–10732.
- Liu, Y., Shakur, Y., and Kambayashi, J. (2011). Phosphodiesterases as Targets for Intermittent Claudication. In *Phosphodiesterases as Drug Targets*, S.H. Francis, M. Conti, and M.D. Houslay, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 211–236.
- Logeart, D., Isnard, R., Resche-Rigon, M., Seronde, M.-F., Groote, P., Jondeau, G., Galinier, M., Mulak, G., Donal, E., Delahaye, F., et al. (2013). Current aspects of the spectrum of acute heart failure syndromes in a real-life setting: the OFICA study. *Eur. J. Heart Fail.* 15, 465–476.
- Loirand, G., Guérin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho Kinases in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Circ. Res.* 98, 322–334.
- Lu, T., Ye, D., He, T., Wang, X., Wang, H., and Lee, H.-C. (2008). Impaired Ca<sup>2+</sup>-Dependent Activation of Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in the Coronary Artery Smooth Muscle Cells of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Biophys. J.* 95, 5165–5177.
- Lu, T., Zhang, D.-M., Wang, X.-L., He, T., Wang, R.-X., Chai, Q., Katusic, Z.S., and Lee, H.-C. (2010). Regulation of Coronary Arterial BK Channels by Caveolae-Mediated Angiotensin II Signaling in Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* 106, 1164–1173.

- Lugnier, C. (2006a). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 109, 366–398.
- Lugnier, C. (2006b). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 109, 366–398.
- Lugnier, C., and Schini, V.B. (1990). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 39, 75–84.
- Lugnier, C., Stierlé, A., Beretz, A., Schoeffter, P., Lebec, A., Wermuth, C.-G., Cazenave, J.-P., and Stoclet, J.-C. (1983). Tissue and substrate specificity of inhibition by alkoxy-aryl-lactams of platelet and arterial smooth muscle cyclic nucleotide phosphodiesterases relationship to pharmacological activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 954–959.
- Luu, T.N., Dashwood, M.R., Chester, A.H., Muddle, J.R., and Yacoub, M.H. (1995). Calcitonin gene-related peptide in healthy and atheromatous human epicardial coronary arteries. Function and receptor characterization. *J. Vasc. Res.* 32, 93–99.
- Lymperopoulos, A., Rengo, G., and Koch, W.J. (2013). Adrenergic Nervous System in Heart Failure. *Circ. Res.* 113, 739–753.
- M A BobriCh, and Shwab, S.A. (2013). PTPIP51: A new interaction partner of the insulin receptor and PKA in adipose tissue.
- Macintyre, D.E., Pearson, J.D., and Gordon, J.L. (1978). Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells. *Nature* 271, 549–551.
- Maggi, C.A., and Meli, A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19, 1–43.
- Mak, D.O., McBride, S., and Foskett, J.K. (1998). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor  $Ca^{2+}$  channel by ligand tuning of  $Ca^{2+}$  inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15821–15825.
- Manganiello, V.C., and Degerman, E. (1999). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases (PDEs): Diverse Regulators of Cyclic Nucleotide Signals and Inviting Molecular Targets for Novel Therapeutic Agents. *Thromb. Haemost.* 82, 407–411.
- Marieb, E.N. (2005). *Anatomie et physiologie humaines* - Elaine N. Marieb (Pearson Education France).
- Marín, J., Encabo, A., Briones, A., García-Cohen, E.-C., and Alonso, M.J. (1998). Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. *Life Sci.* 64, 279–303.
- Mathe, A.A., Hedqvist, P., Strandberg, K., and Leslie, C.A. (2010). Aspects of Prostaglandin Function in the Lung.
- Mathew, R., Wang, J., Gewitz, M.H., Hintze, T.H., and Wolin, M.S. (1993). Congestive heart failure alters receptor-dependent cAMP-mediated relaxation of canine pulmonary arteries. *Circulation* 87, 1722–1728.



- Maurice, D.H., and Haslam, R.J. (1990). Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in cAMP in rat aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* *191*, 471–475.
- Maurice, D.H., Crankshaw, D., and Haslam, R.J. (1991). Synergistic actions of nitrovasodilators and isoprenaline on rat aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* *192*, 235–242.
- Maurice, D.H., Palmer, D., Tilley, D.G., Dunkerley, H.A., Netherton, S.J., Raymond, D.R., Elbatarny, H.S., and Jimmo, S.L. (2003). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity, Expression, and Targeting in Cells of the Cardiovascular System. *Mol. Pharmacol.* *64*, 533–546.
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., and Manganiello, V.C. (2014a). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 290–314.
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., and Manganiello, V.C. (2014b). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 290–314.
- Maurice, J.P., Shah, A.S., Kypson, A.P., Hata, J.A., White, D.C., Glower, D.D., and Koch, W.J. (1999). Molecular  $\beta$ -adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *276*, H1853–H1860.
- McCarron, J.G., Chalmers, S., Bradley, K.N., MacMillan, D., and Muir, T.C. (2006).  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains in smooth muscle. *Cell Calcium* *40*, 461–493.
- McGoldrick, R.B., Kingsbury, M., Turner, M.A., Sheridan, D.J., and Hughes, A.D. (2007). Left ventricular hypertrophy induced by aortic banding impairs relaxation of isolated coronary arteries. *Clin. Sci.* *113*, 473–478.
- McManus, O.B., Helms, L.M.H., Pallanck, L., Ganetzky, B., Swanson, R., and Leonard, R.J. (1995). Functional role of the  $\beta$  subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* *14*, 645–650.
- Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z., and Toro, L. (1996). A calcium switch for the functional coupling between  $\alpha$  (hslo) and  $\beta$  subunits (KV,  $\text{Ca}\beta$ ) of maxi K channels. *FEBS Lett.* *382*, 84–88.
- Meera, P., Wallner, M., and Toro, L. (2000). A neuronal  $\beta$  subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5562–5567.
- Meisheri, K.D., Palmer, R.F., and Van Breemen, C. (1980). The effects of amrinone on contractility,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and cAMP in smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* *61*, 159–165.
- Méry, P.F., Pavoine, C., Pecker, F., and Fischmeister, R. (1995). Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine inhibits cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase in isolated cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* *48*, 121–130.

- Michiels, C., Arnould, T., Knott, I., Dieu, M., and Remacle, J. (1993). Stimulation of prostaglandin synthesis by human endothelial cells exposed to hypoxia. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 264, C866–C874.
- Mika, D., Leroy, J., Vandecasteele, G., and Fischmeister, R. (2012). PDEs create local domains of cAMP signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 323–329.
- Mika, D., Richter, W., and Conti, M. (2015). A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2023–2028.
- Misawa, K., Nitta, Y., Matsubara, T., Oe, K., Kiyama, M., Shimizu, M., and Mabuchi, H. (2002). <B>Difference in Coronary Blood Flow Dynamics between Patients with Hypertension and Those with Hypertrophic Cardiomyopathy</B>. *Hypertens. Res.* 25, 711–716.
- Mitani, A., Nakahara, T., Sakamoto, K., and Ishii, K. (2003). Expression of multidrug resistance protein 4 and 5 in the porcine coronary and pulmonary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 466, 223–224.
- Miura, H., Bosnjak, J.J., Ning, G., Saito, T., Miura, M., and Gutterman, D.D. (2003). Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles. *Circ. Res.* 92, e31–e40.
- Miyoshi, Y., and Nakaya, Y. (1991). Angiotensin II blocks ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 700–706.
- Miyoshi, H., Nakaya, Y., and Moritoki, H. (1994). Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 345, 47–49.
- Miyoshi, Y., Nakaya, Y., Wakatsuki, T., Nakaya, S., Fujino, K., Saito, K., and Inoue, I. (1992). Endothelin blocks ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ. Res.* 70, 612–616.
- Moncada, S., and Vane, J.R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30, 293–331.
- Morales, E., Cole, W.C., Remillard, C.V., and Leblanc, N. (1996). Block of large conductance Ca(2<sup>+</sup>)-activated K<sup>+</sup> channels in rabbit vascular myocytes by internal Mg<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>. *J. Physiol.* 495, 701–716.
- Morgado, M., Cairrão, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. (2011). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 247–266.
- Movat, H.Z., and Fernando, N.V.P. (1963). The fine structure of the terminal vascular bed I. Small arteries with an internal elastic lamina. *Exp. Mol. Pathol.* 2, 549–563.
- Movsesian, M.A., and Kukreja, R.C. (2011). Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Handb. Exp. Pharmacol.* 237–249.
- Münzel, T., Daiber, A., Ullrich, V., and Mülsch, A. (2005). Vascular Consequences of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling for the Activity and Expression of the Soluble

Guanylyl Cyclase and the cGMP-Dependent Protein Kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1551–1557.

Murthy, K.S., and Makhoul, G.M. (1995). Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 268, C171–C180.

Naganuma, K., Omura, A., Maekawara, N., Saitoh, M., Ohkawa, N., Kubota, T., Nagumo, H., Kodama, T., Takemura, M., Ohtsuka, Y., et al. (2009). Discovery of selective PDE4B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 3174–3176.

Naik, J.S., and Walker, B.R. (2003). Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H220–228.

Nakane, T., Tsujimoto, G., Hashimoto, K., and Chiba, S. (1988). Beta adrenoceptors in the canine large coronary arteries: beta-1 adrenoceptors predominate in vasodilation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 936–943.

Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226.

Nasa, Y., Toyoshima, H., Ohaku, H., Hashizume, Y., Sanbe, A., and Takeo, S. (1996). Impairment of cGMP- and cAMP-mediated vasorelaxations in rats with chronic heart failure. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 271, H2228–H2237.

Needleman, P., and Kaley, G. (2010). Cardiac and Coronary Prostaglandin Synthesis and Function.

Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799–802.

Nelson, M.T., and Quayle, J.M. (1995a). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268, C799–822.

Nelson, M.T., and Quayle, J.M. (1995b). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268, C799–822.

Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J., and Lederer, W.J. (1995). Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Calcium *Sparks*. *Science* 270, 633–637.

Nieves-Cintrón, M., Amberg, G.C., Navedo, M.F., Molkentin, J.D., and Santana, L.F. (2008). The control of Ca<sup>2+</sup> influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15623–15628.

Nishida, K., Harrison, D.G., Navas, J.P., Fisher, A.A., Dockery, S.P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R.W., and Murphy, T.J. (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 90, 2092–2096.

Node, K., Kitakaze, M., Kosaka, H., Minamino, T., Funaya, H., and Hori, M. (1997). Amelioration of Ischemia- and Reperfusion-Induced Myocardial Injury by 17 $\beta$ -Estradiol. *Circulation* 96, 1953–1963.

Nyborg, N.C., Baandrup, U., Mikkelsen, E.O., and Mulvany, M.J. (1987). Active, passive and myogenic characteristics of isolated rat intramural coronary resistance arteries. *Pflugers Arch.* 410, 664–670.

Nystoriak, M.A., Nieves-Cintrón, M., Nygren, P.J., Hinke, S.A., Nichols, C.B., Chen, C.-Y., Puglisi, J.L., Izu, L.T., Bers, D.M., Dell’Acqua, M.L., et al. (2014). AKAP150 Contributes to Enhanced Vascular Tone by Facilitating Large-Conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^{+}$  Channel Remodeling in Hyperglycemia and Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* 114, 607–615.

O’Donnell, S.R., and Wanstall, J.C. (1984). The classification of  $\beta$ -adrenoceptors in isolated ring preparations of canine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* 81, 637–644.

Omori, K., and Kotera, J. (2007a). Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.* 100, 309–327.

Omori, K., and Kotera, J. (2007b). Overview of PDEs and Their Regulation. *Circ. Res.* 100, 309–327.

Opherk, D., Mall, G., Zebe, H., Schwarz, F., Weihe, E., Manthey, J., and Kübler, W. (1984). Reduction of coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with arterial hypertension and normal coronary arteries. *Circulation* 69, 1–7.

Oriowo, M.A. (1995). Different atypical  $\beta$ -adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci.* 56, PL269-PL275.

Ostrom, R.S., Liu, X., Head, B.P., Gregorian, C., Seasholtz, T.M., and Insel, P.A. (2002). Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol. Pharmacol.* 62, 983–992.

Ozen, G., and Norel, X. Prostanoids in the pathophysiology of human coronary artery. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*

Packer, M., Carver, J.R., Rodeheffer, R.J., Ivanhoe, R.J., DiBianco, R., Zeldis, S.M., Hendrix, G.H., Bommer, W.J., Elkayam, U., and Kukin, M.L. (1991). Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N. Engl. J. Med.* 325, 1468–1475.

Palmer, D., and Maurice, D.H. (2000). Dual Expression and Differential Regulation of Phosphodiesterase 3A and Phosphodiesterase 3B in Human Vascular Smooth Muscle: Implications for Phosphodiesterase 3 Inhibition in Human Cardiovascular Tissues. *Mol. Pharmacol.* 58, 247–252.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.

Papapetropoulos, A., Marczin, N., Mora, G., Milici, A., Murad, F., and Catravas, J.D. (1995). Regulation of Vascular Smooth Muscle Soluble Guanylate Cyclase Activity, mRNA, and Protein Levels by cAMP-Elevating Agents. *Hypertension* 26, 696–704.

Papapetropoulos, A., Abou-Mohamed, G., Marczin, N., Murad, F., Caldwell, R.W., and Catravas, J.D. (1996). Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 $\beta$ . *Br. J. Pharmacol.* 118, 1359–1366.

Park, W.S., Han, J., and Earm, Y.E. (2008). Physiological role of inward rectifier K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 457, 137.

Parnell, E., Smith, B.O., Palmer, T.M., Terrin, A., Zaccolo, M., and Yarwood, S.J. (2012). Regulation of the inflammatory response of vascular endothelial cells by EPAC1. *Br. J. Pharmacol.* 166, 434–446.

Patterson, A.J., Henrie-Olson, J., and Brenner, R. (2002). Vasoregulation at the Molecular Level: A Role for the  $\beta$ 1 Subunit of the Calcium-Activated Potassium (BK) Channel. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 78–82.

Pavan, B., Biondi, C., and Dalpiaz, A. (2009). Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. *Drug Discov. Today* 14, 982–991.

Peng, W., Hoidal, J.R., and Farrukh, I.S. (1996). Regulation of Ca(2<sup>+</sup>)-activated K<sup>+</sup> channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. *J. Appl. Physiol.* 81, 1264–1272.

Pérez-Martin, A., Aïchoun, I., and Di Rienzo-Ambrozkiwicz, M. (2016). Chapitre 2 - Rappels physiologiques: Organisation générale et régulation du système artériel et de l'endothélium. In *Maladies Artérielles*, S. française de médecine vasculaire Collège des enseignants de médecine vasculaire Collège français de pathologie vasculaire, ed. (Paris: Elsevier Masson), pp. 9–26.

Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442.

Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiß, C., Wang, G.-X., Korth, M., Aszódi, A., Andersson, K.-E., et al. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 17, 3045–3051.

Plüger, S., Faulhaber, J., Fürstenau, M., Löhn, M., Waldschütz, R., Gollasch, M., Haller, H., Luft, F.C., Ehmke, H., and Pongs, O. (2000). Mice With Disrupted BK Channel  $\beta$ 1 Subunit Gene Feature Abnormal Ca<sup>2+</sup> Spark/STOC Coupling and Elevated Blood Pressure. *Circ. Res.* 87, e53–e60.

Pokreisz, P., Vandenwijngaert, S., Bito, V., Bergh, A.V. den, Lenaerts, I., Busch, C., Marsboom, G., Gheysens, O., Vermeersch, P., Biesmans, L., et al. (2009). Ventricular Phosphodiesterase-5 Expression Is Increased in Patients With Advanced Heart Failure and Contributes to Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 119, 408–416.

Polson, J.B., and Strada, S.J. (1996). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Vascular Smooth Muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 403–427.

Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., et al. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failureThe Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of

Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. Eur. Heart J. 37, 2129–2200.

Porter, V.A., Bonev, A.D., Knot, H.J., Heppner, T.J., Stevenson, A.S., Kleppisch, T., Lederer, W.J., and Nelson, M.T. (1998). Frequency modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 274, C1346–C1355.

Potter, L.R., Abbey-Hosch, S., and Dickey, D.M. (2006). Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. Endocr. Rev. 27, 47–72.

Presta, A., Liu, J., Sessa, W.C., and Stuehr, D.J. (1997). Substrate Binding and Calmodulin Binding to Endothelial Nitric Oxide Synthase Coregulate Its Enzymatic Activity. Nitric Oxide 1, 74–87.

Price, J.M., Cabell, J.F., and Hellermann, A. (1996). Inhibition of camp mediated relaxation in rat coronary vessels by block of  $\text{Ca}^{++}$  activated  $\text{K}^{+}$  channels. Life Sci. 58, 2225–2232.

Pries, A.R., and Kuebler, W.M. (2006). Normal Endothelium. In The Vascular Endothelium I, P.S.M.F. FRS, and M.A. Higgs, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–40.

Purves, G.I., Kamishima, T., Davies, L.M., Quayle, J.M., and Dart, C. (2009). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. J. Physiol. 587, 3639–3650.

Quayle, J.M., Nelson, M.T., and Standen, N.B. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. Physiol. Rev. 77, 1165–1232.

Quinn, K.V., Giblin, J.P., and Tinker, A. (2004). Multisite Phosphorylation Mechanism for Protein Kinase A Activation of the Smooth Muscle ATP-Sensitive  $\text{K}^{+}$  Channel. Circ. Res. 94, 1359–1366.

Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. Pharmacol. Rev. 50, 413–492.

Rampersad, S.N., Ovens, J.D., Huston, E., Umana, M.B., Wilson, L.S., Netherton, S.J., Lynch, M.J., Baillie, G.S., Houslay, M.D., and Maurice, D.H. (2010). Cyclic AMP Phosphodiesterase 4D (PDE4D) Tethers EPAC1 in a Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cad)-based Signaling Complex and Controls cAMP-mediated Vascular Permeability. J. Biol. Chem. 285, 33614–33622.

Rautureau, Y., Toumaniantz, G., Serpillon, S., Jourdon, P., Trochu, J.-N., and Gauthier, C. (2002). Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. Br. J. Pharmacol. 137, 153–161.

Reid, J.V., Ito, B.R., Huang, A.H., Buffington, C.W., and Feigl, E.O. (1985). Parasympathetic control of transmural coronary blood flow in dogs. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. 249, H337–H343.

Reinhardt, R.R., Chin, E., Zhou, J., Taira, M., Murata, T., Manganiello, V.C., and Bondy, C.A. (1995). Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. J. Clin. Invest. 95, 1528–1538.

- Rich, T.C., Tse, T.E., Rohan, J.G., Schaack, J., and Karpen, J.W. (2001). In Vivo Assessment of Local Phosphodiesterase Activity Using Tailored Cyclic Nucleotide-Gated Channels as Camp Sensors. *J. Gen. Physiol.* *118*, 63–78.
- Rieg, A.D., Rossaint, R., Verjans, E., Maihöfer, N.A., Uhlig, S., and Martin, C. (2013). Levosimendan Relaxes Pulmonary Arteries and Veins in Precision-Cut Lung Slices - The Role of KATP-Channels, cAMP and cGMP. *PLOS ONE* *8*, e66195.
- Roberts, O.L., Kamishima, T., Barrett-Jolley, R., Quayle, J.M., and Dart, C. (2013a). Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat mesenteric artery. *J. Physiol.* *591*, 5107–5123.
- Roberts, O.L., Kamishima, T., Barrett-Jolley, R., Quayle, J.M., and Dart, C. (2013b). Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat mesenteric artery. *J. Physiol.* *591*, 5107–5123.
- Rokolya, A., and Singer, H.A. (2000). Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *278*, C537–C545.
- Rondinone, C.M., Carvalho, E., Rahn, T., Manganiello, V.C., Degerman, E., and Smith, U.P. (2000). Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 10093–10098.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* *396*, 474–477.
- Roscioni, S.S., Prins, A.G., Elzinga, C.R., Menzen, M.H., Dekkers, B.G., Halayko, A.J., Meurs, H., Maarsingh, H., and Schmidt, M. (2011). Protein kinase A and the exchange protein directly activated by cAMP (Epac) modulate phenotype plasticity in human airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* *164*, 958–969.
- Rosenfeld, C.R., White, R.E., Roy, T., and Cox, B.E. (2000). Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *279*, H319–H328.
- Rozec, B., and Gauthier, C. (2006).  $\beta_3$ -Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.* *111*, 652–673.
- Rozec, B., Serpillon, S., Toumaniantz, G., Sèze, C., Rautureau, Y., Baron, O., Noireaud, J., and Gauthier, C. (2005). Characterization of Beta<sub>3</sub>-Adrenoceptors in Human Internal Mammary Artery and Putative Involvement in Coronary Artery Bypass Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* *46*, 351–359.
- Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E., and Beavo, J.A. (2003). Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function. *Circ. Res.* *93*, 280–291.
- Sadhu, K., Hensley, K., Florio, V.A., and Wolda, S.L. (1999). Differential Expression of the Cyclic GMP-stimulated Phosphodiesterase PDE2A in Human Venous and Capillary Endothelial Cells. *J. Histochem. Cytochem.* *47*, 895–905.

Saeki, T., and Saito, I. (1993a). Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. *Biochem. Pharmacol.* 46, 833–839.

Saeki, T., and Saito, I. (1993b). Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. *Biochem. Pharmacol.* 46, 833–839.

Sanchez, M., and McManus, O.B. (1996). Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* 35, 963–968.

Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V.O., Hatem, S.N., Aubart, F.C., Russel, F.G., Mougenot, N., Vrignaud, C., Lechat, P., et al. (2008). Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J. Clin. Invest.* 118, 2747–2757.

Satake, N., Fujimoto, S., and Shibata, S. (1996). The potentiation of nitroglycerin-induced relaxation by PKG inhibition in rat aortic rings. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 27, 701–705.

Sathishkumar, K., Ross, R.G., Bawankule, D.U., Sardar, K.K., Prakash, V.R., and Mishra, S.K. (2005). Segmental heterogeneity in the mechanism of sodium nitroprusside-induced relaxation in ovine pulmonary artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 45, 491–498.

Sausbier, M., Arntz, C., Bucurenciu, I., Zhao, H., Zhou, X.-B., Sausbier, U., Feil, S., Kamm, S., Essin, K., Sailer, C.A., et al. (2005). Elevated Blood Pressure Linked to Primary Hyperaldosteronism and Impaired Vasodilation in BK Channel-Deficient Mice. *Circulation* 112, 60–68.

Schaeffer, H.J., and Schwender, C.F. (1974). Enzyme inhibitors. 26. Bridging hydrophobic and hydrophilic regions on adenosine deaminase with some 9-(2-hydroxy-3-alkyl) adenines. *J. Med. Chem.* 17, 6–8.

Schiffrin, E.L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 43, 19–29.

Schlossmann, J., and Hofmann, F. (2005). cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov. Today* 10, 627–634.

Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G.-X., Allescher, H.-D., Korth, M., Wilm, M., et al. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature* 404, 197–201.

Schmidt, P.M., Schramm, M., Schröder, H., Wunder, F., and Stasch, J.-P. (2004). Identification of Residues Crucially Involved in the Binding of the Heme Moiety of Soluble Guanylate Cyclase. *J. Biol. Chem.* 279, 3025–3032.

Schoeffter, P., Lugnier, C., Demesy-Waeldele, F., and Stoclet, J.C. (1987). Role of cyclic AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases in the control of cyclic nucleotide levels and smooth muscle tone in rat isolated aorta. *Biochem. Pharmacol.* 36, 3965–3972.

Schröter, J., Zahedi, R.P., Hartmann, M., Gaßner, B., Gazinski, A., Waschke, J., Sickmann, A., and Kuhn, M. (2010). Homologous desensitization of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide, is associated with a complex phosphorylation pattern. *FEBS J.* 277, 2440–2453.



- Schwabe, U., Miyake, M., Ohga, Y., and Daly, J.W. (1976). 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a Potent Inhibitor of Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphate Phosphodiesterases in Homogenates and Tissue Slices from Rat Brain. *Mol. Pharmacol.* 12, 900–910.
- Scott, J.D., and Santana, L.F. (2010). A-Kinase Anchoring Proteins. *Circulation* 121, 1264–1271.
- Seasholtz, T.M., Majumdar, M., and Brown, J.H. (1999). Rho as a Mediator of G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Mol. Pharmacol.* 55, 949–956.
- Shi, Y., Man, R.Y.K., and Vanhoutte, P.M. (2008). Two isoforms of cyclooxygenase contribute to augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 29, 185–192.
- Shmigel, A.V., Eisner, D.A., and Wray, S. (1998). Properties of voltage-activated  $[Ca^{2+}]_i$  transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J. Physiol.* 511, 803–811.
- Shu Zhu, White, R.E., and Barman, S.A. (2008). Original Research: Role of phosphodiesterases in modulation of BKCa channels in hypertensive pulmonary arterial smooth muscle. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2, 119–127.
- Silver, P.J., Schmidt-Silver, C., and DiSalvo, J. (1982). beta-Adrenergic relaxation and cAMP kinase activation in coronary arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 242, H177–H184.
- Silver, P.J., Walus, K., and DiSalvo, J. (1984). Adenosine-mediated relaxation and activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in coronary arterial smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 342–347.
- Silverthorn, D.U., Silverthorn, A.C., Johnson, B.R., Ober, W.-C., and Garrison, C. (2007). *Physiologie humaine : Une approche intégrée* (Paris: Pearson).
- Snyder, P.B., Esselstyn, J.M., Loughney, K., Wolda, S.L., and Florio, V.A. (2005). The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis. *J. Lipid Res.* 46, 494–503.
- Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003).  $Ca^{2+}$  Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol. Rev.* 83, 1325–1358.
- Sooch, S., and Marshall, I. (1997). Atypical  $\beta$ -Adrenoceptors in the Rat Vasculature. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 812, 211–212.
- Souness, J.E., Diocee, B.K., Martin, W., and Moodie, S.A. (1990). Pig aortic endothelial-cell cyclic nucleotide phosphodiesterases. Use of phosphodiesterase inhibitors to evaluate their roles in regulating cyclic nucleotide levels in intact cells. *Biochem. J.* 266, 127–132.
- Spasova, M.A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16586–16591.

- Standen, and Quayle (1998). K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol. Scand.* 164, 549–557.
- Steinberg, S.F., Jaffe, E.A., and Bilezikian, J.P. (1984). Endothelial cells contain beta adrenoreceptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 325, 310–313.
- Sudo, T., Tachibana, K., Toga, K., Tochizawa, S., Inoue, Y., Kimura, Y., and Hidaka, H. (2000a). Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem. Pharmacol.* 59, 347–356.
- Sudo, T., Tachibana, K., Toga, K., Tochizawa, S., Inoue, Y., Kimura, Y., and Hidaka, H. (2000b). Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem. Pharmacol.* 59, 347–356.
- Sunahara, R.K., and Taussig, R. (2002). Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling. *Mol. Interv.* 2, 168.
- Surks, H.K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S.P., Tang, K.M., Ito, M., Lincoln, T.M., and Mendelsohn, M.E. (1999). Regulation of Myosin Phosphatase by a Specific Interaction with cGMP- Dependent Protein Kinase I $\alpha$ . *Science* 286, 1583–1587.
- Sutko, J.L., Airey, J.A., Welch, W., and Ruest, L. (1997). The Pharmacology of Ryanodine and Related Compounds. *Pharmacol. Rev.* 49, 53–98.
- Suttorp, N., Weber, U., Welsch, T., and Schudt, C. (1993). Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J. Clin. Invest.* 91, 1421–1428.
- Tabrizchi, R., and Bedi, S. (2001). Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. *Pharmacol. Ther.* 91, 133–147.
- Takahashi, K., Osanai, T., Nakano, T., Wakui, M., and Okumura, K. (2002). Enhanced activities and gene expression of phosphodiesterase types 3 and 4 in pressure-induced congestive heart failure. *Heart Vessels* 16, 249–256.
- Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H.G., and Toro, L. (1997). Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant  $\alpha + \beta$  subunit complexes. *J. Physiol.* 502, 545–557.
- Tanaka, Y., Koike, K., Alioua, A., Shigenobu, K., Stefani, E., and Toro, L. (2004).  $\beta$ 1-Subunit of MaxiK Channel in Smooth Muscle: a Key Molecule Which Tunes Muscle Mechanical Activity. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 339–347.
- Tanaka, Y., Tang, G., Takizawa, K., Otsuka, K., Eghbali, M., Song, M., Nishimaru, K., Shigenobu, K., Koike, K., Stefani, E., et al. (2006). K<sub>v</sub> Channels Contribute to Nitric Oxide- and Atrial Natriuretic Peptide-Induced Relaxation of a Rat Conduit Artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 341–354.
- Tao, J., Zhou, Z.L., Wu, B., Shi, J., Chen, X.M., and Ji, Y.H. (2014). Recombinant expression and functional characterization of martentoxin: a selective inhibitor for BK channel ( $\alpha + \beta$ 4). *Toxins* 6, 1419–1433.

Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol. Rev.* 84, 137–167.

Taylor, S.S., Buechler, J.A., and Yonemoto, W. (1990). cAMP-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971–1005.

Telezhkin, V., Brazier, S.P., Mears, R., Müller, C.T., Riccardi, D., and Kemp, P.J. (2011). Cysteine residue 911 in C-terminal tail of human BKCa $\alpha$  channel subunit is crucial for its activation by carbon monoxide. *Pflug. Arch.-Eur. J. Physiol.* 461, 665–675.

Tep-areenan, P., Kendall, D.A., and Randall, M.D. (2003). Mechanisms of vasorelaxation to 17 $\beta$ -oestradiol in rat arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 476, 139–149.

Tian, L., Coghill, L.S., McClafferty, H., MacDonald, S.H.-F., Antoni, F.A., Ruth, P., Knaus, H.-G., and Shipston, M.J. (2004). Distinct stoichiometry of BKCa channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11897–11902.

Tilley, D.G., and Maurice, D.H. (2002). Vascular Smooth Muscle Cell Phosphodiesterase (PDE) 3 and PDE4 Activities and Levels are Regulated by Cyclic AMP in Vivo. *Mol. Pharmacol.* 62, 497–506.

Trochu, J.-N., Leblais, V., Rautureau, Y., Bévérilli, F., Le Marec, H., Berdeaux, A., and Gauthier, C. (1999). Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* 128, 69–76.

Tuppin, P., Cuerq, A., de Peretti, C., Fagot-Campagna, A., Danchin, N., Juillière, Y., Alla, F., Allemand, H., Bauters, C., Drici, M.-D., et al. (2014). Two-year outcome of patients after a first hospitalization for heart failure: A national observational study. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 107, 158–168.

Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J.P., Nishida, K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Nerem, R.M., and Harrison, D.G. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 269, C1371–C1378.

Vatner, S.F., and Hittinger, L. (1993). Coronary vascular mechanisms involved in decompensation from hypertrophy to heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22, 34A–40A.

Venema, R.C., Venema, V.J., Ju, H., Harris, M.B., Snead, C., Jilling, T., Dimitropoulou, C., Maragoudakis, M.E., and Catravas, J.D. (2003). Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 285, H669–H678.

Vettel, C., Lindner, M., Dewenter, M., Lorenz, K., Schanbacher, C., Riedel, M., Lämmle, S., Meinecke, S., Mason, F.E., Sossalla, S., et al. (2016). Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* CIRCRESAHA.116.310069.

Villanueva, C., and Giulivi, C. (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 307–316.

- Wan, E., Kushner, J.S., Zakharov, S., Nui, X., Chudasama, N., Kelly, C., Waase, M., Doshi, D., Liu, G., Iwata, S., et al. (2013). Reduced vascular smooth muscle BK channel current underlies heart failure-induced vasoconstriction in mice. *FASEB J.* 27, 1859–1867.
- Wang, R., and Wu, L. (1997). The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 8222–8226.
- Webb, A., Bond, R., McLean, P., Uppal, R., Benjamin, N., and Ahluwalia, A. (2004). Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia–reperfusion damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13683.
- Wechsler, J., Choi, Y.-H., Krall, J., Ahmad, F., Manganiello, V.C., and Movsesian, M.A. (2002). Isoforms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase PDE3A in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 38072–38078.
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 463–472.
- Wei-Wei, S.H.I., Yang, Y., Yun, S.H.I., and Chun, J. (2012). KATP channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao* 64, 1.
- Wellman, G.C., Santana, L.F., Bonev, A.D., and Nelson, M.T. (2001). Role of phospholamban in the modulation of arterial Ca<sup>2+</sup> sparks and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by cAMP. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 281, C1029–C1037.
- White, R.E., Darkow, D.J., and Lang, J.L.F. (1995). Estrogen Relaxes Coronary Arteries by Opening BKCa Channels Through a cGMP-Dependent Mechanism. *Circ. Res.* 77, 936–942.
- White, R.E., Kryman, J.P., El-Mowafy, A.M., Han, G., and Carrier, G.O. (2000). cAMP-Dependent Vasodilators Cross-Activate the cGMP-Dependent Protein Kinase to Stimulate BKCa Channel Activity in Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 86, 897–905.
- Williams, D.L., Katz, G.M., Roy-Contancin, L., and Reuben, J.P. (1988). Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 9360–9364.
- Wilson, L.S., Baillie, G.S., Pritchard, L.M., Umana, B., Terrin, A., Zaccolo, M., Houslay, M.D., and Maurice, D.H. (2011). A Phosphodiesterase 3B-based Signaling Complex Integrates Exchange Protein Activated by cAMP 1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signals in Human Arterial Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 16285–16296.
- Wolin, M.S. (2009). Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 296, H539–H549.
- Wooldridge, A.A., MacDonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hartshorne, D.J., and Haystead, T.A.J. (2004). Smooth Muscle Phosphatase Is Regulated in Vivo by Exclusion of Phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by Phosphorylation of Serine 695 in Response to Cyclic Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 279, 34496–34504.
- Wray, S., and Smith, R.D. (2004). Mechanisms of action of pH-induced effects on vascular smooth muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 263, 163–172.

Wu, R.S., and Marx, S.O. (2010). The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney:  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. *Kidney Int.* 78, 963–974.

Wu, X., and Davis, M.J. (2001). Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 280, H1751–H1761.

Wu, K.-D., Bungard, D., and Lytton, J. (2001). Regulation of SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pump expression by cytoplasmic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 280, C843–C851.

Wu, L., Cao, K., Lu, Y., and Wang, R. (2002). Different mechanisms underlying the stimulation of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels by nitric oxide and carbon monoxide. *J. Clin. Invest.* 110, 691–700.

Wu, X., Haystead, T.A.J., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., and Somlyo, A.P. (1998). Acceleration of Myosin Light Chain Dephosphorylation and Relaxation of Smooth Muscle by Telokin SYNERGISM WITH CYCLIC NUCLEOTIDE-ACTIVATED KINASE. *J. Biol. Chem.* 273, 11362–11369.

Xie, J., and McCobb, D.P. (1998). Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* 280, 443–446.

Xin, W., Li, N., Cheng, Q., and Petkov, G.V. (2014a). BK Channel-Mediated Relaxation of Urinary Bladder Smooth Muscle: A Novel Paradigm for Phosphodiesterase Type 4 Regulation of Bladder Function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 56–65.

Xin, W., Li, N., Cheng, Q., and Petkov, G.V. (2014b). BK Channel-Mediated Relaxation of Urinary Bladder Smooth Muscle: A Novel Paradigm for Phosphodiesterase Type 4 Regulation of Bladder Function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 56–65.

Yan, C., Miller, C.L., and Abe, J. (2007). Regulation of Phosphodiesterase 3 and Inducible cAMP Early Repressor in the Heart. *Circ. Res.* 100, 489–501.

Yan, J., Olsen, J.V., Park, K.-S., Li, W., Bildl, W., Schulte, U., Aldrich, R.W., Fakler, B., and Trimmer, J.S. (2008). Profiling the Phospho-status of the BKCa Channel  $\alpha$  Subunit in Rat Brain Reveals Unexpected Patterns and Complexity. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 2188–2198.

Yanaka, N., KUROSAWA, Y., MINAMI, K., KAWAI, E., and OMORI, K. (2003). cGMP-Phosphodiesterase Activity Is Up-regulated in Response to Pressure Overload of Rat Ventricles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 973–979.

Yu, X., Ma, H., Barman, S.A., Liu, A.T., Sellers, M., Stallone, J.N., Prossnitz, E.R., White, R.E., and Han, G. (2011). Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 301, E882–E888.

Zabel, U., Kleinschnitz, C., Oh, P., Nedvetsky, P., Smolenski, A., Müller, H., Kronich, P., Kugler, P., Walter, U., Schnitzer, J.E., et al. (2002). Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* 4, 307–311.

Zaccolo, M., and Movsesian, M.A. (2007). cAMP and cGMP Signaling Cross-Talk. *Circ. Res.* 100, 1569–1578.

- Zamah, A.M., Delahunty, M., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002). Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Regulates Its Coupling to Gs and Gi DEMONSTRATION IN A RECONSTITUTED SYSTEM. *J. Biol. Chem.* 277, 31249–31256.
- Zhai, K., Chang, Y., Wei, B., Liu, Q., Leblais, V., Fischmeister, R., and Ji, G. (2014a). Phosphodiesterase types 3 and 4 regulate the phasic contraction of neonatal rat bladder smooth myocytes via distinct mechanisms. *Cell. Signal.* 26, 1001–1010.
- Zhai, K., Chang, Y., Wei, B., Liu, Q., Leblais, V., Fischmeister, R., and Ji, G. (2014b). Phosphodiesterase types 3 and 4 regulate the phasic contraction of neonatal rat bladder smooth myocytes via distinct mechanisms. *Cell. Signal.* 26, 1001–1010.
- Zhang, F., Kaide, J.I., Rodriguez-Mulero, F., Abraham, N.G., and Nasjletti, A. (2001a). Vasoregulatory function of the heme-heme oxygenase-carbon monoxide system. *Am. J. Hypertens.* 14, 62S–67S.
- Zhang, F., Kaide, J., Wei, Y., Jiang, H., Yu, C., Balazy, M., Abraham, N.G., Wang, W., and Nasjletti, A. (2001b). Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H350–H358.
- Zhang, H.-T., Wang, Y., Deng, X.-L., Dong, M.-Q., Zhao, L.-M., and Wang, Y.-W. (2010). Daidzein relaxes rat cerebral basilar artery via activation of large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 630, 100–106.
- Zhao, W., Uehara, Y., Chu, G., Song, Q., Qian, J., Young, K., and Kranias, E.G. (2004). Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 607–612.
- Zhou, Z., Gross, S., Roussos, C., Meurer, S., Müller-Esterl, W., and Papapetropoulos, A. (2004). Structural and Functional Characterization of the Dimerization Region of Soluble Guanylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* 279, 24935–24943.
- ZhuGe, R., Fogarty, K.E., Tuft, R.A., and Walsh, J.V. (2002). Spontaneous Transient Outward Currents Arise from Microdomains Where BK Channels Are Exposed to a Mean  $\text{Ca}^{2+}$  Concentration on the Order of 10  $\mu\text{M}$  during a  $\text{Ca}^{2+}$  Spark. *J. Gen. Physiol.* 120, 15–27.
- Zieba, B.J., Artamonov, M.V., Jin, L., Momotani, K., Ho, R., Franke, A.S., Nepl, R.L., Stevenson, A.S., Khromov, A.S., Chrzanowska-Wodnicka, M., et al. (2011). The cAMP-responsive Rap1 Guanine Nucleotide Exchange Factor, Epac, Induces Smooth Muscle Relaxation by Down-regulation of RhoA Activity. *J. Biol. Chem.* 286, 16681–16692.
- Zweier, J.L., Samouilov, A., and Kuppusamy, P. (1999). Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1411, 250–262.
- Zwiler, J., Revel, M.-O., and Basset, P. (1981). Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1381–1387.
- Zwiler, J., Revel, M.-O., and Malviya, A.N. (1985). Protein kinase C catalyzes phosphorylation of guanylate cyclase in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 1350–1353.

