

Université de Montréal

**Présence nucléaire et rôle de la monoxyde d'azote synthase endothéliale
dans la régulation de la transcription génique**

par

Antoinette Geha

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en pharmacologie

Décembre 2004

© Antoinette Geha, 2004



W

4

U58

2006

V. 026

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Présence nucléaire et rôle de la monoxyde d'azote synthase endothéliale dans
la régulation de la transcription génique**

présenté par :

Antoinette Geha

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : _____ **Pedro D'Orléans-Juste**

Directeur de recherche : _____ **Sylvain Chemtob**

Codirecteur de recherche : _____ **Fernand Jr. Gobeil**

Membre du jury : _____ **Janos Filep**

Mémoire accepté : Avril 2005

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	v
Summary.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 LE MONOXYDE D'AZOTE (NO).....	1
1.1.1 Historique et rôle du NO.....	1
1.1.2 Mécanismes d'action du NO.....	1
1.1.2.1 Effets directs du NO sur la GCs.....	3
1.1.2.2 Effets indirects du NO sur des protéines.....	4
1.1.2.2.1 S-nitrosylation.....	4
1.1.2.2.2 Nitration sur tyrosine	5
1.1.2.3 Interactions avec les canaux ioniques.....	6
1.2 GUANYLATE CYCLASE SOLUBLE (GCs).....	6
1.2.1 Structure de la GCs	6
1.2.2 Effecteurs de la GCs	7
1.3 LES ENZYMES DE SYNTHÈSE DU NO.....	8
1.3.1 Isoformes des NOS.....	9

1.3.2	Structure des NOS.....	10
1.3.2.1	Domaine réductase et domaine oxygénase.....	10
1.3.2.2.	Domaine calmoduline.....	11
1.3.3	Mécanisme de catalyse des NOS.....	12
1.3.4	Contrôle de l'expression des NOS.....	13
1.3.5	Déficiencia en NOS	13
1.3.6	Régulation de l'activité des NOS.....	14
1.3.6.1	Calmoduline (CaM).....	14
1.3.6.2	Canaux ionique.....	15
1.3.6.3	MAP kinases	16
1.3.6.4	Phosphorylation.....	16
1.3.6.5	Protéine inhibitrice des NOS (PIN).....	19
1.3.6.6	Protéine de choc thermique (Hsp90).....	19
1.3.7	Inhibiteurs des NOS.....	20
1.3.8	Localisation intracellulaire de la eNOS	21
1.3.8.1	Myristoylation et palmitoylation.....	21
1.3.8.2	Cavéoline-1 et ou cavéoline-3.....	22
1.3.8.3	Récepteurs et protéines.....	23
1.3.9	Localisation des NOS dans différents organites.....	25
1.3.9.1	Dans les membranes plasmiques et les cavéoles.....	25
1.3.9.2	Dans le réticulum endoplasmique.....	26
1.3.9.3	Dans l'appareil de golgi.....	26
1.3.9.4	Dans les mitochondries.....	26
1.3.9.5	Dans le cytosquelette.....	27

1.3.9.6	Dans le noyau.....	27
1.4	LE NOYAU COMME ORGANITE.....	28
1.4.1	Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).....	29
1.4.2	Acide lysophosphatidique (LPA) et récepteurs au LPA (LPA Rs).....	30
1.4.3	Calcium nucléaire.....	32
1.4.4	Facteur de transcription NF-kappa B (NF-kB).....	35
1.4.5	Mitogen activated protein kinases (MAPKs).....	35
1.5	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	37
	CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	39
2.1	Réactifs chimiques et anticorps.....	39
2.2	Animaux.....	40
2.3	Fractionnement cellulaire et isolation nucléaire.....	40
2.4	Culture cellulaire et transfection.....	40
2.5	Analyse immunocytochimique et confocale.....	41
2.6	Immunohistochimie cryomicroscopique et électronique.....	42
2.7	Analyse par immunobuvardage de eNOS et GCs.....	42
2.8	Mesure de la production de nitrites dans les noyaux isolés de foie de rat.....	43
2.9	Mesure de la production de GMPc par radioimmunoessai dans les noyaux isolés de foie de rat	44
2.10	Mesure des signaux calciques dans les noyaux isolés de foie de rat	44
2.11	Analyse par immunobuvardage des MAP kinases.....	45

2.12	Essai de transcription de gènes.....	45
2.13	Liaison du NF-κB à la séquence consensus d'ADN.....	46
2.14	Analyse statistique.....	46
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....		47
3.1	Translocation et localisation nucléaire de la eNOS déterminée par immunofluorescence et microscopie électronique.....	46
3.2	Présence périnucléaire et intranucléaire de eNOS et GCs détectée par des analyses d'immunobuvardage de type western blot (pour eNOS et GCs) et par microscopie électronique (pour GCs).....	52
3.3	Activité nucléaire de la eNOS mesurée à l'aide de la production de nitrite et à l'aide de la phosphorylation de la eNOS nucléaire induite par le LPA dans les noyaux isolés de foie de rat	55
3.4	Activité nucléaire de la GCs mesurée à l'aide de la production de GMPc dans les noyaux isolés de foie de rat.....	58
3.5	Le NO induit la mobilisation nucléaire du Ca ²⁺	60
3.6	Le NO active les MAPKs nucléaire.....	63
3.7	Le NO induit la transcription du gène iNOS par un mécanisme dépendant du Ca ²⁺ nucléaire, de la voie GCs/PKG nucléaire, des MAPKs et du NF-κB.....	63
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....		68
CHAPITRE 5 : CONCLUSION ET DIRECTIONS FUTURES.....		79
CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES.....		80

SOMMAIRE

Certaines études suggèrent mais ne démontrent pas de façon conclusive que l'enzyme de synthèse du NO endothéliale (eNOS) pourraient se retrouver dans des sites intracellulaires notamment, le noyau. Le but de notre étude fut d'étudier la présence de la eNOS au niveau nucléaire ainsi que du rôle du NO dans la transcription génique. Dans ce mémoire, nous avons démontré par microscopie confocale que l'enzyme eNOS peut transloquer au niveau nucléaire dans des cellules COS-1 et HTC4 transfectées avec le gène eNOS-GFP ainsi que dans des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porc nouveau-né (PCEC). Des analyses en microscopie électronique ont montré une présence nucléaire basale de la eNOS au niveau périnucléaire et nucléaire dans des hépatocytes de tissus de foie de rat. Cette présence fut confirmée par des analyses d'immunobuvardage dans des noyaux d'hépatocytes de foie de rat (NFR). Par ailleurs, nous avons démontré que le récepteur du NO, l'enzyme guanylate cyclase soluble (GCs) est également présente au niveau périnucléaire et nucléaire des NFR. Des études de mesure de production de nitrite ainsi que des études de phosphorylation nous ont confirmé que l'enzyme eNOS peut être active au noyau suite à une stimulation de NFR avec l'acide lysophosphatidique (LPA) connu pour activer la eNOS. Par ailleurs, la stimulation de NFR à l'aide du donneur de NO, le sodium nitroprussiate (SNP) a induit une production de GMPC par la GCs nucléaire. Finalement, la signalisation nucléaire du NO fut étudiée, et nous avons découvert qu'une stimulation de NFR avec le SNP pouvait induire l'expression du gène pro-inflammatoire de l'enzyme de synthèse du NO inductible (iNOS), expression qui est dépendante d'une voie impliquant la GCs et la protéine kinase G (PKG), le calcium, les ERK1/2, ainsi que le NF- κ B. Cette étude décrit pour la première fois une transcription du gène pro-inflammatoire iNOS par le NO produit de façon locale au niveau du noyau.

Mots-clés : monoxyde d'azote, enzyme de synthèse du monoxyde d'azote, noyau, transcription génique, inflammation.

SUMMARY

Nuclear localization of eNOS has been proposed, but not clearly demonstrated and, with no appointed functions. In the present study, we investigated the nuclear presence of eNOS and the possible role of nuclear NO in transcription. Using confocal microscopy, we demonstrated that eNOS is able to translocate into the nucleus of eNOS-GFP transfected COS-1 cells and in porcine cerebral microvascular endothelial cells (PCEC). Electron microscopy performed on rat liver hepatocytes showed a perinuclear and nuclear distribution of eNOS. Presence of eNOS at the cell nucleus was further revealed by Western blot on rat liver nuclei (RLN) subcellular fractions. We demonstrated that the NO receptor, soluble guanylate cyclase (sGC) is also present at the perinuclear and nuclear region of RLN. Nitrite production and phosphorylation studies in isolated RLN confirm that nuclear eNOS is active after stimulation with lysophosphatidic acid (LPA), which is a known eNOS activator. Moreover, stimulation of isolated RLN with the NO donor, sodium nitroprusside (SNP) induced cGMP production by the nuclear sGC. Finally, NO nuclear signalling was studied and we discovered that nuclear stimulation with SNP evoked the expression of the pro-inflammatory gene iNOS. This expression appeared to be induced by sGC, protein kinase G (PKG), calcium, ERK1/2, and NF- κ B. This study describes for the first time expression of the pro-inflammatory gene iNOS by NO produced locally in the nucleus.

Keywords : nitric oxide, nitric oxide synthase, nucleus, gene expression, inflammation.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1- Phénotypes des souris déficientes en NOS.....	14
Tableau 2- Inhibiteurs des enzymes de synthèse du monoxyde d'azote (NOS).....	21

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1- Résumé de la chimie du NO.....	2
Figure 1.2- Oxydation de la L-arginine.....	9
Figure 1.3- Représentation schématique des isoformes de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) et du cytochrome P-450 réductase.....	11
Figure 1.4- Mécanisme régulant l'activité de eNOS dans les cellules endothéliales.....	17
Figure 1.5- Protéines interagissant avec eNOS pouvant réguler son routage dans la cellule.....	24
Figure 1.6- Schéma résumant les voies de signalisation induites par le récepteur du LPA....	31
Figure 1.7- Voie de signalisation du calcium dans le noyau.....	34
Figure 3.1- I) Translocation de eNOS au noyau suite à une stimulation avec le LPA.....	48
Figure 3.1-II) Détection in situ de eNOS sur des sections de tissus de foie de rat par microscopie électronique.....	50
Figure 3.2- Distribution subcellulaire des protéines eNOS et GCs.....	53
Figure 3.3- Activité nucléaire de la eNOS mesurée à l'aide de la production de nitrites et	

à l'aide de la phosphorylation de la eNOS nucléaire induite par le LPA dans les noyaux isolés de foie de rat.....56

Figure 3.4- Activité nucléaire de la GCs déterminée par la mesure de la production de GMPc dans les noyaux isolés de foie de rat.....59

Figure 3.5- SNP induit une mobilisation du calcium dose-dépendante dans les noyaux isolés de foie de rat61

Figure 3.6- Activation de la voie de signalisation des MAPKs par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat64

Figure 3.7- Effecteurs impliqués dans la transcription du gène iNOS induite par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat.....66

Figure 4- Résumé des résultats obtenus69

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- [Ca²⁺]_i : concentration intracellulaire du calcium
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- ARNn : ARN nucléaire
- ATP : adénosine triphosphate
- BH₄ : tétrahydrobioptérine
- CaM : calmoduline
- EDRF : facteur de relaxation dérivé de l'endothélium
- eNOS : enzyme de synthèse du monoxyde d'azote endothéliale
- ERK : kinase régulée par un signal extracellulaire
- FAD : flavine adénine dinucléotide
- FMN : flavine mononucléotide
- GCs : guanylate cyclase soluble
- GTP : guanosine 5'-triphosphate
- GMPC : 3',5'-cyclic guanosine monophosphate
- IEG : Immediate-early-gene
- iNOS : enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible
- LPA : acide lysophosphatidique
- MAPK : mitogen-activated protein kinase
- MEK : mitogen-activated protein kinase kinase
- NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B : Facteur nucléaire-kappa B

NLS : signal de localisation nucléaire

nNOS : enzyme de synthèse du monoxyde d'azote neuronale

NO : monoxyde d'azote

NO₂⁻ : nitrite

NO₂ : dioxyde d'azote

NO₃⁻ : nitrate

O₂^{-•} : anion superoxyde

O₂ : oxygène

O₂¹ : oxygène singulet

O₂²⁻ : ion peroxyde

ONOO⁻ : anion peroxydinitrite

PKG : protéine kinase dépendante du GMPc

PTX : toxine de pertussis

RE : réticulum endoplasmique

RT-PCR : réaction en chaîne de la polymérase transcriptase-inverse

SDS-PAGE : Dodécyl sulfate de sodium-électrophorèse en gel de polyacrylamide

VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon Directeur de recherche Dr. Sylvain Chemtob (Département de Pharmacologie, Université de Montréal) de m'avoir accueilli chaleureusement dans son laboratoire et d'avoir cru en mon potentiel. Mille merci pour vos conseils d'une grande qualité dans l'accomplissement de ce projet innovateur.

J'aimerais aussi remercier mon Co-Directeur Dr. Fernand Gobeil Jr. (Département de Pharmacologie, Université de Sherbrooke) qui, malgré les responsabilités provenant de l'ouverture récente de son laboratoire, a su toujours être présent et patient pour répondre à mes questions et me guider avec des idées brillantes dans ce projet. Merci beaucoup pour ton aide précieuse.

Je voudrais spécialement remercier Dr. Anne Marilise Marrache de m'avoir appris les techniques essentielles dans la manipulation des noyaux isolés. Grâce à elle, j'ai bien pu maîtriser la technique et j'ai avancé à grand pas dans mon projet. Merci pour ton aide indispensable dans l'accomplissement de ce projet et ta grande patience.

Je suis reconnaissante envers le Dr. Alfredo Ribeiro-da-Silva (Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University) pour ses bons conseils et son expertise en microscopie électronique. Je le remercie aussi de m'avoir permis d'effectuer mes expériences dans son laboratoire.

Je voudrais remercier Dr. Ghassan Bkaily (Département d'Anatomie et de Biologie cellulaire, Université de Sherbrooke) pour sa collaboration et sa permission pour l'utilisation du microscope confocale et Mony Nader pour son aide technique indispensable.

Je remercie Dr. Jean-Philippe Gratton (Institut de recherches cliniques de Montréal) de nous avoir gentiment fourni l'ADNc du eNOS-GFP pour mes expériences.

Je veux spécialement remercier Josée Champagne, Bupe Mwaikambo, Josiane Lafleur et Mélissa Paiement pour leur encouragement et leur amitié tout au long de ma maîtrise.

Je veux aussi remercier Hensy Fernandez ainsi que tous les membres du laboratoire pour leurs aide et leurs conseils dans certaines de mes expériences.

Finalement je suis reconnaissante envers la Fondation de l'Hôpital Ste-Justine ainsi que la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 LE MONOXYDE D'AZOTE (NO)

1.1.1 Historique et rôle du NO

La découverte de la nature endogène du monoxyde d'azote (NO) a été l'un des accomplissements majeurs en biochimie durant ces dernières années. En 1980, Furchgott et Zawadzki ont trouvé que la relaxation des vaisseaux sanguins en réponse à l'acétylcholine avait besoin d'un endothélium intact (Furchgott R.F. *et al.*, 1980). Le NO a été identifié comme le facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF) (Palmer R.M. *et al.*, 1987; Ignarro L.J. *et al.*, 1987).

Le NO endogène est formé à partir de la L-arginine par oxydation du groupe aminé guanidine par catalyse avec l'enzyme de synthèse du NO (Palmer R.M. *et al.*, 1988). Le NO endogène est connu pour être impliqué dans plusieurs processus physiologiques importants, agissant en tant que régulateur du débit sanguin (Moncada S. *et al.*, 1989; Vanhoutte P.M., 1989; Ignarro L.J., 1990), que neurotransmetteur central et périphérique (Knowles R.G. *et al.*, 1989) et comme agent cytotoxique (Hibbs J.B. Jr *et al.*, 1987). De plus, le NO inhibe l'agrégation plaquettaire (Busse R. *et al.*, 1987) et est considéré comme étant un vasodilatateur endogène.

1.1.2 Mécanismes d'action du NO

La figure 1.1 résume la chimie du NO. Les concentrations et les sources du NO sont les facteurs majeurs qui déterminent les effets biologiques du NO (Wink D.A. *et al.*, 1998). À des concentrations faibles (< 1 μ M), les effets directs du NO prédominent. À des concentrations

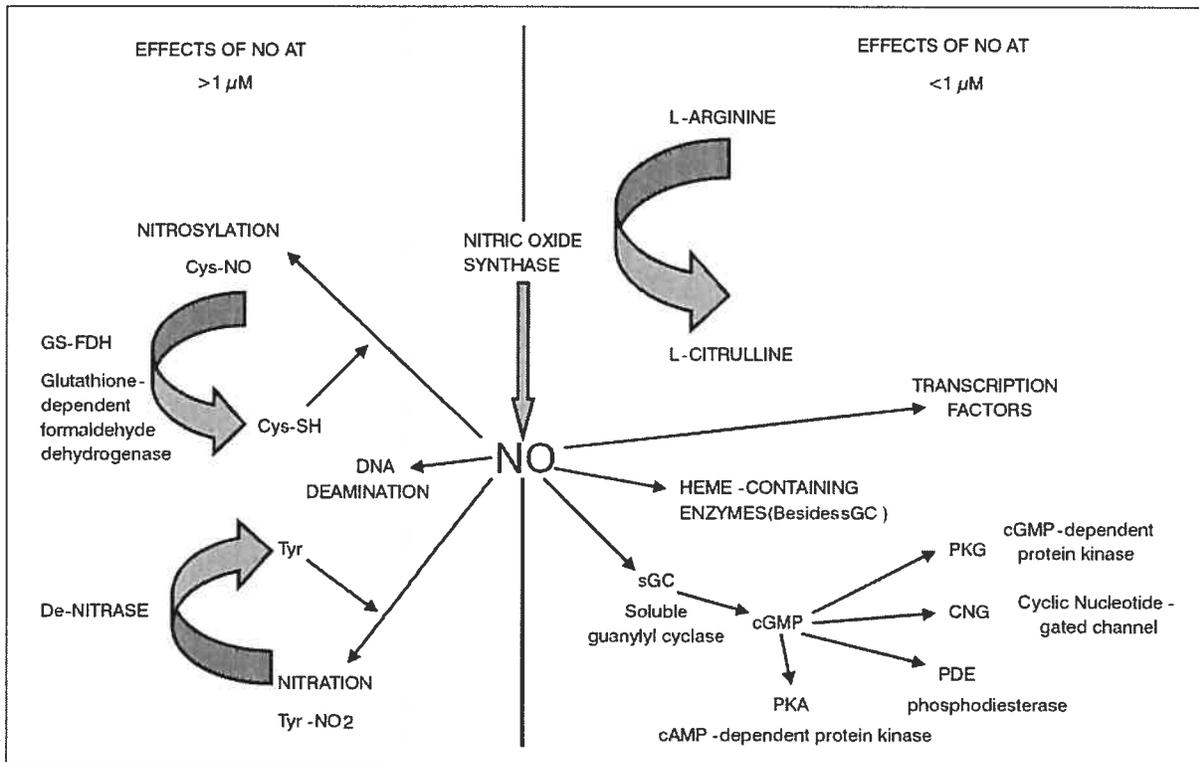


Figure 1.1- Résumé de la chimie du NO¹. Les effets NO montrés à gauche sont induits à des concentrations de NO élevés, alors que les effets du NO, montrés à droite sont induits à des concentrations de NO plus faibles.

élevées (> 1 μM), les effets indirects du NO engendrés par les espèces d'azote réactives (RNS) prévalent.

Les effets directs du NO impliquent pour la majorité une interaction du NO avec des complexes métalliques. Les réactions du NO avec des protéines contenant un noyau hème sont les plus importantes du point de vue physiologique et incluent des interactions avec l'enzyme guanylate cyclase soluble (GCs) (Martin E. *et al.*, 2000) et le cytochrome P450 (Wink D.A. *et al.*, 1993). Le NO peut également interagir avec des protéines sans noyaux hème, d'autres métaux de

¹ Tiré de : Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:203-36.

transition tel que le zinc, des radicaux de protéines, les ribonucléotides réductases, et les cyclooxygénases (Davis K.L. *et al.*, 2001; Hanafy K.A. *et al.*, 2001).

Les effets indirects du NO, produits à travers l'interaction du NO avec l'O₂ ou le O₂^{•-}, incluent la nitrosylation (lorsqu'un NO⁺ est ajouté à une amine, thiol, ou groupe aromatique hydroxyl), l'oxydation (lorsqu'un ou deux électrons sont enlevés d'un substrat) et la nitration (lorsqu'un NO²⁺ est ajouté à une molécule) (Wink D.A. *et al.*, 1998). Dans les solutions aqueuses, le NO peut subir l'autoxydation (i.e. réaction avec O₂) pour former du N₂O₃; ce composé peut par la suite être hydrolyser pour former du nitrite (Ford P.C. *et al.*, 1993). Non seulement le NO peut être autoxydé, mais il peut également réagir avec le O₂^{•-} pour produire le puissant oxydant, le peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Huie R.E. *et al.*, 1993). Le ONOO⁻ agit comme agent de nitration pouvant modifier les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

1.1.2.1 Effets directs du NO sur la GCs

Durant les conditions biologiques normales, les concentrations de NO sont faibles (< 1 μM) et plus probablement, le NO va interagir avec des complexes hèmes dans les protéines, tels que la guanylate cyclase soluble (GCs), l'hémoglobine, le cytochrome P450, ou la protoporphyrine IX (Davis K.L. *et al.*, 2001). La plupart des actions physiologiques du NO proviennent de l'activation de la GCs dans le muscle lisse qui transforme 1 mole de guanosine 5'-triphosphate (GTP) en 1 mole de 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (GMPC) et 1 mole de pyrophosphate (Murad F. *et al.*, 1990; Ignarro L.J. *et al.*, 1991; Hobbs A.J. *et al.*, 1997). La liaison du NO au noyau hème de la GCs induit un changement de conformation qui augmente l'activité enzymatique de ~ 400 fois (Katsuki S. *et al.*, 1977).

1.1.2.2 Effets indirects du NO sur des protéines

1.1.2.2.1 S-nitrosylation

La S-nitrosylation de résidus cystéines résultante de l'addition d'un groupe NO^+ modifie l'activité de plusieurs protéines. Puisqu'il est improbable que le NO agisse directement sur le résidu cystéine, le NO interagit donc avec l' O_2 ou le $\text{O}_2^{\cdot-}$ afin de produire des RNS capables de nitrosyler des résidus cystéines. La nitrosylation est une réaction chimique et non pas une réaction catalysée par une enzyme. Par contre, il semblerait qu'il existe une certaine spécificité dans la nitrosylation. Premièrement, ce ne sont pas toutes les protéines possédant des résidus cystéines disponibles qui deviennent nitrosylées. La localisation subcellulaire ainsi que l'environnement chimique local (i.e. la concentration locale de NO et des molécules qui réagissent avec le NO tel que $\text{O}_2^{\cdot-}$ et les protéines avec un noyau hème) peuvent dicter, jusqu'à un certain point, quelles protéines peuvent être nitrosylées.

La nitrosylation modifie les fonctions de plusieurs protéines incluant le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Choi Y.B. *et al.*, 2000), la $\text{p}21^{\text{Ras}}$ (Lander H.M. *et al.*, 1997), la caspase-3 (Mannick J.B. *et al.*, 1999), et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Molina y Vedia L. *et al.*, 1992), suggérant que la nitrosylation puisse être un mécanisme de régulation cellulaire important.

La nitrosylation peut également moduler l'activité de plusieurs canaux. La nitrosylation d'un résidu cystéine unique sur la face intracellulaire du canal nucléotide cyclique (CNG) impliqué dans les signaux de transduction de la vision et l'odorat résulte en une activation du canal (Broillet M.C. *et al.*, 1996; Broillet M.C., 2000). Une polynitrosylation du canal de relâche du calcium cardiaque (récepteur ryanodine) résulte également en une activation du canal (Xu L. *et al.*, 1998).

1.1.2.2 Nitration sur tyrosine

La formation de nitrotyrosine a été démontrée par des marquages immunohistologiques dans plusieurs maladies humaines et des modèles d'animaux de maladies. La nitration de résidus tyrosine semble être sélective. Il est important de souligner que malgré que la nitration sur tyrosine a été démontrée dans plusieurs conditions pathologiques, la formation de nitrotyrosine semble également survenir sous des conditions basales. Non seulement la nitration sur tyrosine est sélective, mais il y a de plus en plus de preuves expérimentales qu'elle peut être réversible (Kamisaki Y. *et al.*, 1998; Gow A.J. *et al.*, 1996). Le mécanisme *in vivo* de la nitration sur un résidu tyrosyl a été une source de controverse durant plusieurs années. Le peroxy-nitrite formé de la réaction entre le NO et le $O_2^{\cdot-}$ semblait être l'agent majeur de nitration *in vivo*. Par contre, il semble avoir également des mécanismes de nitration sur tyrosine indépendant du peroxy-nitrite (Eiserich J.P. *et al.*, 1996; 1998)

L'observation de nitration sur des résidus tyrosiles dans de nombreuses maladies humaines a amené l'idée que la nitration de résidus tyrosine dans les protéines a des conséquences fonctionnelles. La nitrotyrosine a été détectée dans des plaques athérosclérotiques de vaisseaux sanguins par immunohistochimie et Western Blot (Beckman J.S. *et al.*, 1996; Buttery L.D. *et al.*, 1996). Un marquage élevé de nitrotyrosine a été également détecté dans des neurones moteurs de patients avec la maladie de sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Abe K. *et al.*, 1995).

La formation de nitrotyrosine a été également identifiée dans plusieurs modèles d'animaux de maladies. Dans le cœur, la formation de nitrotyrosine a été détectée dans des injures ischémie-reperfusion ainsi que dans l'inflammation du myocarde (Bachmaier K. *et al.*, 1997; Ishiyama S. *et al.*, 1997). La nitration sur tyrosine a été identifiée dans des injures induites par des endotoxines dans les reins (Bian K. *et al.*, 1999) ainsi que dans l'hypertension rénale

(Bosse H.M. *et al.*, 1997). Ce n'est que dans quelques maladies que les protéines modifiées par nitrotyrosine ont été identifiées. On note par exemple, la protéine prostacycline synthase (Zou M.H. *et al.*, 1998; 1999), la manganèse superoxide dismutase (Mn SOD) (MacMillan-Crow L.A. *et al.*, 1996), la protéine de la sous-unité du filament de faible poids moléculaire (Strong M.J. *et al.* 1998), l'ATPase du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique, l'isoforme SERCA2a (Viner R.I. *et al.*, 1996) ainsi que la protéine pulmonaire SP-A (Haddad I.Y. *et al.*, 1994).

1.1.2.3 Interactions avec les canaux ioniques

Le NO peut également moduler l'activité des canaux ioniques. Il est en mesure d'inhiber l'activité électrique et les courants ioniques dans les cellules β du pancréas (Krippeit-Drews P. *et al.*, 1995). Le NO peut aussi réguler les canaux calciques de type L dans les cellules cardiaques (Raeymaekers L. *et al.*, 1988; Mery P.F. *et al.*, 1991, 1993) et les muscles lisses vasculaires (Ishikawa T. *et al.*, 1993). Par ailleurs, les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) (Miyoshi H. *et al.*, 1994), ceux sensibles au calcium (K_{Ca}) dans les muscles lisses vasculaires (Taniguchi J. *et al.*, 1993; Robertson B.E. *et al.*, 1993) et les muscles lisses du tube digestif (Koh S.D. *et al.*, 1995) peuvent être modulés par le NO par un mécanisme dépendant du GMPc (Taniguchi J. *et al.*, 1993; Robertson B.E. *et al.*, 1993) et de la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) ou directement via le NO (Bolotina V.M. *et al.*, 1994; Abderrahmane A. *et al.*, 1998).

1.2 GUANYLATE CYCLASE SOLUBLE (GCs)

1.2.1 Structure de la GCs

La guanylate cyclase existe sous deux formes : soluble et membranaire. Il a été établi que ces deux formes sont non seulement deux protéines différentes, mais deux enzymes régulées

différemment (Tremblay J. *et al.*, 1988). La guanylate cyclase soluble, récepteur qui est activé par le NO, est un hétérodimère avec deux sous-unités distinctes, α et β , qui rendent l'enzyme active (Schulz S. *et al.*, 1991). Il existe au moins deux isoformes de chaque sous-unité : α_1 , α_2 , β_1 et β_2 . La taille de l'ARNm de la sous-unité α est approximativement 5.5 kb et celle de sa protéine est de 73-82 kDa. La taille de l'ARNm de la sous-unité β est approximativement 4.2 kb et celle de sa protéine est de 70-76 kDa (Nakane M. *et al.*, 1988). Une caractéristique de cette enzyme est la présence dans sa molécule de groupes sulfhydriques labiles. L'oxydation de ces groupes stimule l'activité enzymatique (Braugher J.M. *et al.*, 1980). Par contre, une exposition à plus long terme de l'enzyme à des oxidants résulte en une perte d'activité (Braugher J.M. *et al.*, 1979). Une deuxième caractéristique de la guanylate cyclase soluble est la présence d'hème dans sa molécule (Gerzer R. *et al.*, 1981). Il est connu que le précurseur immédiat de l'hème *in vivo* est la protoporphyrine IX, qui semble être un activateur potentiel de l'enzyme (Ignarro L.J. *et al.*, 1982). L'insertion de fer dans le noyau porphyrine résulte en une ferroporphyrine IX (ou hème) qui agit en tant qu'inhibiteur de l'enzyme (Ignarro L.J. *et al.*, 1984). La séquence des réactions résultant en la formation de l'holoenzyme guanylate cyclase appelée protoporphyrine IX-fer-hème-guanylate cyclase demeure obscure. Par contre, ce système est essentiel à la régulation endogène de la guanylate cyclase.

1.2.2 Effecteurs de la GCs

À travers la production de GMPc, la GCs exerce plusieurs effets physiologiques tels que la régulation du tonus et de la mobilité du muscle lisse vasculaire, la phototransduction et la maintenance de l'homéostasie des électrolytes et du fluide. Pour ce faire, le GMPc agit directement sur ses effecteurs (voir Fig. 1.1). Une cible majeure du GMPc est la famille des

protéines kinases dépendantes du GMPc ou les PKGs. Lorsque le GMPc se lie à la PKG, cette dernière devient active en tant qu'une sérine/thréonine kinase (Lucas K.A. *et al.*, 2000). Une fois activée, la PKG peut agir sur plusieurs substrats, incluant le récepteur IP₃ (Komalavilas P. *et al.*, 1994) la vimentine et les sous-unités de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (Surks H.K. *et al.*, 1999) . Une autre cible du GMPc sont les canaux CNG. Les CNG régulent le flux du Na⁺ et Ca²⁺ dans les cellules et sont ouverts par la liaison au GMPc. L'activation de canal CNG par le GMPc est critique afin de réguler la phototransduction et la neurotransmission dans la rétine (Biel M. *et al.*, 1999; Lucas K.A. *et al.*, 2000). Les dernières cibles du GMPc sont les phosphodiésterases (PDEs) régulées par le GMPc. Les PDEs sont cruciaux pour l'hydrolyse et la modulation des concentrations intracellulaires des nucléotides cycliques. Il existe plusieurs familles de PDEs qui diffèrent selon leur spécificité pour l'hydrolyse du GMPc et/ou l'AMPc et également l'expression spécifique tissulaire.

La voie de signalisation GMPc/PKGI peut être impliquée dans le contrôle de la transcription génique de plusieurs éléments de réponse (élément de réponse au sérum, site de liaison à AP1, et élément de réponse à l'AMPc) (Gudi et al., 1996, 1997).

1.3 LES ENZYMES DE SYNTHÈSE DU NO (NOS)

Le NO est synthétisé de façon endogène par les cellules de mammifères à partir de la L-arginine par une famille d'enzymes de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) qui utilisent l'oxygène et requièrent cinq cofacteurs : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), flavine adénine dinucléotide (FAD), flavine mononucléotide (FMN), l'hème et la tétrahydrobioptérine (BH₄) (Knowles R.G. *et al.*, 1994). Les NOS possèdent deux domaines principaux : le domaine réductase situé au COOH terminal et le domaine oxygénase situé au NH₂ terminal, avec un domaine de liaison à la calmoduline situé entre les deux.

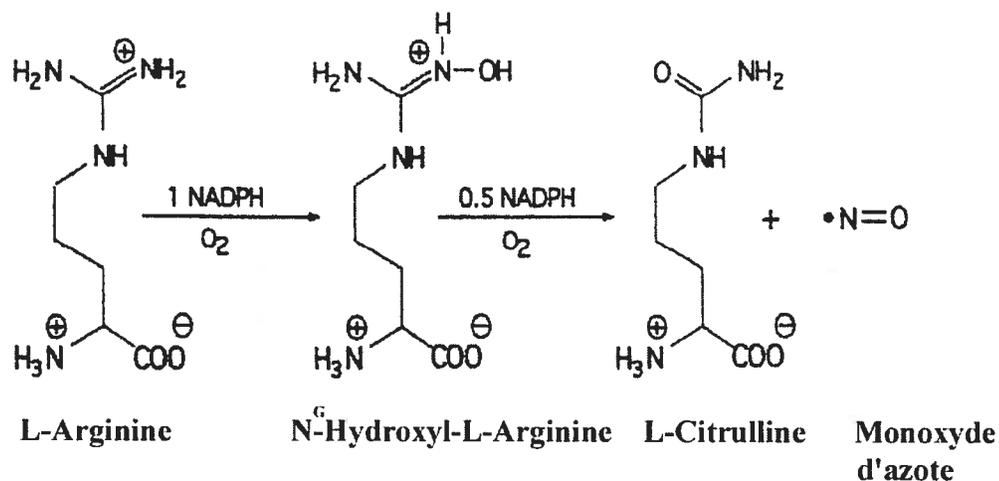


Figure 1.2- Oxydation de la L-arginine. L'enzyme NOS produit du NO en catalysant l'oxydation du groupement guanine de la L-arginine.

1.3.1 Isoformes des NOS

Trois isoformes NOS ont été identifiées jusqu'à ce jour. La première forme constitutive (nNOS ou NOS1), purifiée à l'origine des tissus neuronaux centraux et périphériques, se retrouve également dans l'épithélium des bronches humaines, dans la trachée de rat (Kobzik L. *et al.*, 1993) ainsi que de façon abondante dans le muscle squelettique (Nakane M. *et al.*, 1993). La deuxième enzyme constitutive (eNOS ou NOS3) purifiée et clonée à l'origine des cellules endothéliales vasculaires a été retrouvée dans les myocytes cardiaques, les plaquettes sanguines, le cerveau (hippocampes) et également ailleurs (Michel T. *et al.*, 1997). La troisième forme, (iNOS ou NOS2) purifiée et clonée à l'origine d'une lignée cellulaire de macrophages a été découverte plus tard dans les myocytes cardiaques, les cellules gliales et les cellules du muscle lisse vasculaire (Michel, T., *et al.* 1997).

Chaque NOS est codée par un gène distinct compris entre 26 exons (iNOS et eNOS) et 29 exons (nNOS) (Nathan C., 1992; Knowles R.G. *et al.*, 1994). De récentes découvertes suggèrent que l'expression de la nNOS puisse être régulée par un épissage alternatif menant à la production de plusieurs transcrits d'ARNm; ceci permet la production de protéines nNOS avec différentes caractéristiques enzymatiques (Brenman J.E. *et al.*, 1997). Le rôle de ceci reste à déterminer.

1.3.2 Structure des NOS

1.3.2.1 Domaine réductase et domaine oxygénase

L'identité des séquences en acides aminés des trois isoformes est ~ 55%, avec de fortes séquences conservées dans les régions des protéines impliquées dans la catalyse (Michel T. *et al.*, 1995). Toutes les protéines NOS possèdent une structure à deux domaines et la dimérisation en homodimères, chacun approximativement de 260 kDa, est requise pour l'activité enzymatique. L'extrémité C-terminale de la protéine NOS ressemble à la portion réductase du cytochrome P-450 (Figure 1.3). Elle possède plusieurs des mêmes sites de liaisons aux cofacteurs et effectue les mêmes fonctions. Par conséquent, cette partie est appelée « domaine réductase ». À l'extrémité C-terminale, il y a une région de liaison au NADPH qui est conservée dans les trois NOS et s'aligne parfaitement avec le cytochrome P-450 réductase. Il y a également des sites de liaison à la flavine adénine dinucléotide (FAD) ainsi qu'à la flavine mononucléotide (FMN) (Bredt D.S. *et al.*, 1991; Djordjevic S. *et al.*, 1995). Le « domaine oxygénase » est situé à l'extrémité N-terminal et permet l'oxygénation de son substrat, la L-arginine, au site de liaison hème de la protéine. Des quantités stœchiométriques d'hème sont présentes dans les NOS et sont requises pour l'activité catalytique de l'enzyme (White K.A. *et al.*, 1992).

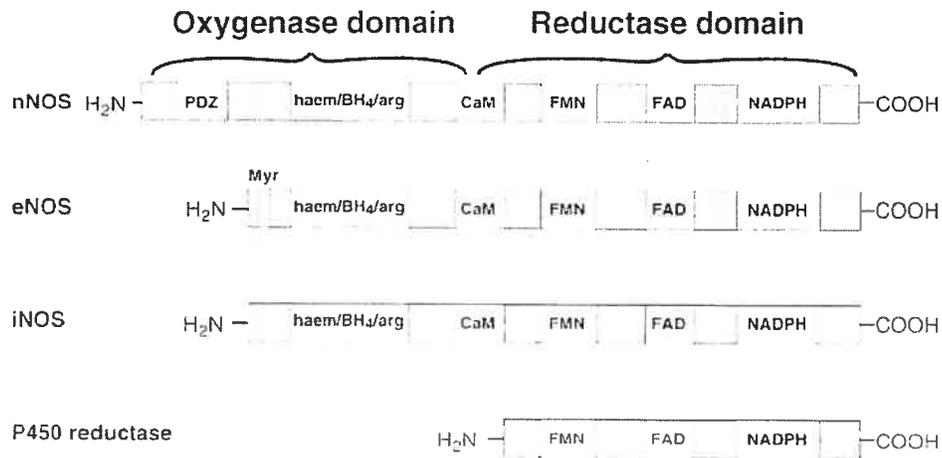


Figure 1.3 : Représentation schématique des isoformes de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) et du cytochrome P-450 réductase². Hème (Haem); domaine PDZ (PDZ); calmoduline (CaM); flavine mononucléotide (FMN); flavine adénine dinucléotide (FAD). Les cofacteurs pour les NOS semblent non seulement nécessaires pour l'activité catalytique mais également pour la dimérisation de monomères en protéines actives. Les dimères de protéines actives sont dépendants de la présence de l'hème, de la tétrahydrobioptérine (BH₄) et de L-arginine.

1.3.2.2 Domaine calmoduline

Le domaine calmoduline relie le domaine réductase au domaine oxygénase. Son rôle consiste à réguler le flux d'électrons entre les deux régions (Abu Soud H.M. *et al.*, 1993). L'activité des trois isoformes de la NOS semble être dépendante de la calmoduline, qui se lie à nNOS et eNOS à des concentrations intracellulaire élevées en calcium ($[Ca^{2+}]_i$) alors qu'elle est associée de façon permanente avec iNOS à un niveau de calcium basal. Donc, les activités de la nNOS et de la eNOS sont modulées par les changements en $[Ca^{2+}]_i$ amenant à une production de

² Tiré de : Hobbs A.J., Higgs A., Moncada S. (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* ; 39:191-220.

NO transitoire, alors que iNOS produit du NO continuellement, indépendamment des fluctuations du $[Ca^{2+}]_i$ (Nathan, C., *et al.*, 1994). L'activité de la iNOS est principalement régulée via l'induction de l'expression de gènes, malgré que l'expression constitutive de la iNOS ait été trouvée dans certains types cellulaires (Gath, I. *et al.*, 1996; Guo F. H. *et al.*, 1995).

1.3.3 Mécanisme de catalyse des NOS

Les différentes isoformes NOS possèdent le même schéma catalytique, comprenant l'oxydation des cinq électrons de l'azote guanido terminal de l'acide aminé L-arginine pour former le NO plus la L-citrulline (Palmer R.M. *et al.*, 1989) dans une réaction impliquant l'oxygène moléculaire et le NADPH comme co-substrats, avec d'autres cofacteurs redox incluant l'hème lié à l'enzyme, les thiols réduits, le FAD, le FMN et la tétrahydrobioptérine. La réaction est dépendante de l'oxygène et du NADPH et produit de la L-citrulline et du NO dans une stoechiométrie 1 : 1 (Bush P.A. *et al.*, 1992)

Par contre, le mécanisme précis par lequel les NOS catalysent l'oxydation de la L-arginine en NO demeure obscur. Plusieurs aspects de la biochimie des NOS sont reliés directement aux actions du cytochrome P-450. Le NADPH agit en tant que source d'électrons pour l'activation de l'oxygène et l'oxydation du substrat. Le FAD et le FMN, tant qu'à eux, transportent les électrons du NADPH à l'hème. Le noyau hème des NOS ressemble à celui de la cytochrome P-450, supportant l'idée que l'hème des NOS représente le centre catalytique responsable de la liaison et de la réduction de l'oxygène moléculaire et de l'oxydation subséquente du substrat. De façon contraire au cytochrome P-450, les NOS requièrent le BH_4 pour leur activité maximale (Kwon N.S. *et al.*, 1989). Les isoformes NOS sont sujets à une boucle de contrôle négative engendrée par le NO (Rogers N.E. *et al.*, 1992; Assreuy J. *et al.*,

1993) via la liaison du NO au noyau hème. Par ailleurs, le BH₄ est en mesure de prévenir la boucle de contrôle négative et même si l'explication pour ce phénomène demeure obscure, ceci pourrait être un des rôles du BH₄ comme cofacteur (Griscavage J.M. *et al.*, 1994).

1.3.4 Contrôle de l'expression des NOS

Peu est connu sur la régulation de l'expression des NOS, surtout pour le cas de la iNOS qui, contrairement aux eNOS et nNOS, n'est pas exprimée de façon constitutive mais induite sous l'influence de médiateurs inflammatoires et de produits bactériens. Alors que la iNOS contient la calmoduline fermement liée, l'activité de l'enzyme est régulée par l'expression de la protéine. La région en 5' du gène iNOS humain possède approximativement 66% d'homologie au gène murin (Chartrain N.A., *et al.*, 1994), et les deux gènes contiennent des séquences consensus conservées pour le NF- κ B, des éléments de réponse à l'interféron- γ , et un élément de réponse au facteur TNF.

1.3.5 Déficience en NOS

Des souris transgéniques pour la nNOS (Huang P.L. *et al.*, 1993), la eNOS (Huang P.L. *et al.*, 1995) et la iNOS (Wei X.Q. *et al.*, 1995) ont été générées et ont permis de comprendre leur rôle et leurs importances chez l'animal (Tableau 1).

Tableau 1- Phénotypes des souris déficientes en NOS

Sous-type de NOS	Phénotype
Neuronale (nNOS, type 1) ¹	Viables, fertiles Sténose pylorique hypertrophique Résistance aux accidents cérébrovasculaire Comportements agressifs et inappropriés Potentialisation à long terme normale Absence d'anomalie histopathologique au cerveau
Inductible (iNOS, type 2) ²	Viables, fertiles et sans anormalités Susceptibilité accrue aux infections à <i>Listeria</i> et à <i>Leishmania</i> Prolifération de cellules lymphomiques Résistance à l'hypertension produite par les endotoxines
Endothéliale (eNOS, type 3) ³	Déficiencie de la vasodilatation induite par l'acétylcholine Augmentation de la pression artérielle moyenne

¹ Huang P.L. *et al.*, 1993 ; Dinerman J.L. *et al.*, 1994 ; Brenman J.E. *et al.*, 1996

² Wei X.Q. *et al.*, 1995

³ Huang P.L. *et al.*, 1995

1.3.6 Régulation de l'activité des NOS

1.3.6.1 Calmoduline (CaM)

La première protéine liant les NOS qui a été découverte est la calmoduline (Bredt D.S. *et al.* 1990). Elle est requise pour le flux d'électrons et donc la production de NO par les trois isoformes de NOS. nNOS et eNOS ont un plus grand besoin de Ca²⁺ que le iNOS. La liaison à la

CaM augmente la vitesse de transfert d'électrons du NADPH au domaine réductase des flavines (Gachhui R. *et al.*, 1996; Gachhui R. *et al.*, 1998) et des accepteurs d'électrons artificiels tels que la ferricyanide et le cytochrome c (Gachhui R. *et al.*, 1998); de plus, elle induit le transfert d'électrons du domaine réductase au centre hème (Abu-Soud H.M. *et al.*, 1994). Les structures primaires de nNOS et eNOS sont différentes de celle de iNOS puisqu'elles possèdent 40-50 acides aminés insérés dans le milieu du sous-domaine de liaison FMN, qui a été décrit comme étant une boucle auto-inhibitrice (Salerno J.C. *et al.*, 1997). L'analyse de mutants de eNOS et nNOS avec cette boucle en moins a montrée que l'insert agit en déstabilisant la liaison de la CaM à une faible concentration en Ca^{2+} et en inhibant le transfert d'électrons du FMN au hème en absence de Ca^{2+} /CaM (Nishida C.R. *et al.*, 1999; Daff S. *et al.*, 1999)

1.3.6.2 Canaux ionique

Plusieurs voies de signalisation semblent réguler la eNOS. L'activation de l'enzyme en réponse à plusieurs agonistes tels que l'œstrogène, la bradykinine, et le VEGF a lieu en association avec des augmentations des concentrations du calcium cytosolique (Goetz R.M. *et al.*, 1999; Gosink E.C. *et al.*, 1993; Papapetropoulos A. *et al.*, 1997).

Par contre, l'activation de eNOS par les forces de cisaillement et la contraction isométrique de vaisseaux semble survenir de façon indépendante des niveaux de calcium (Ayajiki K. *et al.*, 1996; Fleming I. *et al.*, 1999).

L'activation de l'enzyme induite par les forces de cisaillement est régulée par des canaux potassiques et est abolit par l'inhibition de la tyrosine kinase, indiquant que ce processus implique également une phosphorylation sur tyrosine (Ayajiki K. *et al.*, 1996; Ohno M. *et al.*, 1993; Corson M.A. *et al.*, 1996).

1.3.6.3 MAP kinases

Il existe aussi des preuves expérimentales pour un rôle des MAP kinases dans la modulation de l'activité de la eNOS par des agonistes extracellulaires, l'activation des MAP kinase, par l'œstrogène et la bradykinine amène à une stimulation et inactivation de la eNOS respectivement (Chen Z. *et al.*, 1999; Bernier S.G. *et al.*, 2000).

1.3.6.4 Phosphorylation

La phosphorylation est un mécanisme important pour la régulation post-traductionnelle de diverses protéines cellulaires allant d'enzymes métaboliques à des protéines de signalisation en passant par des facteurs de transcription. La phosphorylation de la eNOS permettrait un « cross talk » entre le NO et d'autres voies de signalisation et pourrait servir de modulateur pour d'autres modifications post-traductionnelle de la eNOS. Récemment, la phosphorylation sur résidu tyrosyl de la eNOS a été détectée dans des cellules endothéliales intactes traitées avec de fortes concentrations de l'inhibiteur des phosphatases, le sodium orthovanadate (Garcia-Cardena G. *et al.*, 1996 b). Des approches pharmacologiques ont également indiqué que la phosphorylation sur résidu tyrosyl est également nécessaire pour l'activation de eNOS par l'œstrogène et le VEGF (Papapetropoulos A. *et al.*, 1997; Chen Z. *et al.*, 1999).

La phosphorylation de eNOS sur des résidus séryls (Ser1177) par plusieurs protéines kinases a été démontrée dans des cellules endothéliales intactes (voir Figure 1.4). Ces kinases incluent la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), la PKC, la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et de la sérine/thréonine kinase Akt qui est aussi connue comme étant la protéine kinase B (PKB).

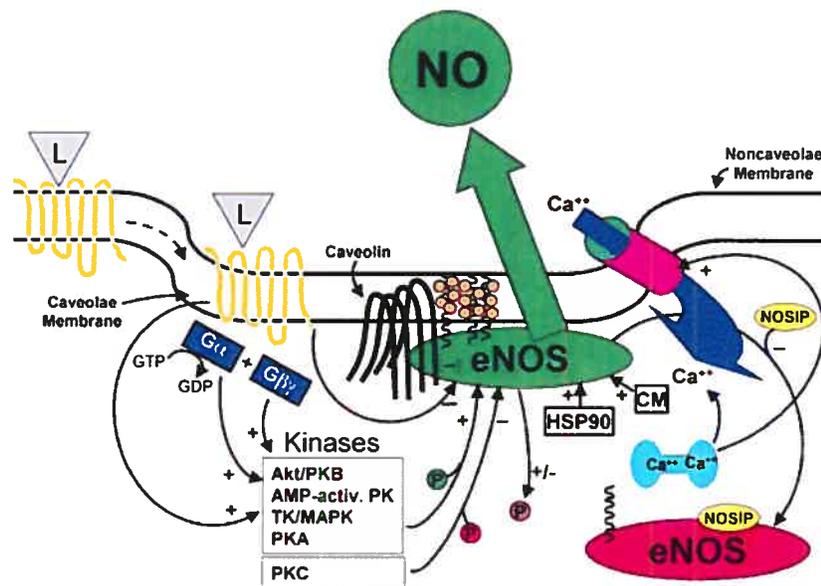


Figure 1.4- Mécanisme régulant l'activité de eNOS dans les cellules endothéliales³. eNOS est localisée dans les cavéoles enrichies de cholestérol (cercles orange) par myristoylation et palmitoylation, où l'interaction avec la cavéoline inhibe l'activité de l'enzyme. Une stimulation typique de la eNOS est initiée par un ligand (L) qui se lie à des récepteurs de la membrane plasmique, résidant habituellement dans les cavéoles ou qui sont mobilisés dans ces dernières après activation.. L'activation de ces récepteurs active des voies de signalisation de plusieurs protéines kinases à travers un processus engendré par des protéines G. La phosphorylation de la eNOS résulte en une stimulation (+) ou une inactivation (-) de la eNOS dépendant de la kinase impliquée, et du site de la phosphorylation. La déphosphorylation peut également stimuler ou inhiber l'enzyme. L'activité de la eNOS requiert la liaison de la calmoduline liée au calcium. L'activité de la eNOS peut être augmentée par la liaison au HSP90 et peut être diminuée par l'association avec des domaines C-terminaux de certains récepteurs couplés aux protéines G.

³ Tiré de : Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. Annu Rev Physiol. 2002; 64:749-74.

La eNOS peut être régulée par divers agonistes, tels que l'œstrogène (Lantin-Hermoso R.L. *et al.*, 1997; Haynes M.P. *et al.*, 2000; Hisamoto K. *et al.*, 2001), la force de cisaillement (Dimmeler S. *et al.*, 1999; Gallis B. *et al.*, 1999), le VEGF (Dimmeler S. *et al.*, 1999; Michell B.J. *et al.*, 1999; Fulton D. *et al.*, 1999), l'insuline (Kim F. *et al.*, 2001), la bradykinine (Fleming I. *et al.*, 2001), l'acide lysophosphatidique (LPA) (Kou R. *et al.*, 2002) et le IGF-1 (facteur de croissance semblable à l'insuline-1) (Michell B.J. *et al.*, 1999).

Des kinases impliquées dans ce processus varient selon le stimuli appliqué. Par exemple, l'œstrogène, la force de cisaillement, le VEGF, l'IGF-1 ainsi que le LPA phosphorylent eNOS via la voie PI3-K/Akt alors que la phosphorylation sur Ser1177 induite par la bradykinine est médiée par la CaMKII (Fleming I. *et al.*, 2001). Lorsque la Ser1177 est phosphorylée, le flux d'électrons passe à travers le domaine réductase, et comme conséquence, la production de NO est augmentée deux à trois fois en comparaison au niveau basal (McCabe T.J. *et al.*, 2000). La phosphorylation sur sérine de la eNOS induite par un agoniste est associée avec la translocation de cette enzyme (Michel T. *et al.*, 1993).

De façon contraire à l'activation de la eNOS survenant avec la phosphorylation de la Ser-1177, la phosphorylation de la thréonine à la position 497 atténue l'activité de la eNOS (Chen Z.P. *et al.*, 1999). Il existe des preuves expérimentales d'une régulation coordonnée de l'activité de la eNOS par des agonistes tels que le VEGF, qui cause en même temps la phosphorylation de la Ser-1177 et la déphosphorylation de la Thr-497 (Michell B.J. *et al.*, 2001). Des travaux récents ont montré que la signalisation par la PKA amène une phosphorylation de la eNOS sur la Ser-1177 et une déphosphorylation de la Thr-497, augmentant ainsi l'activité enzymatique, alors que la PKC induit une déphosphorylation de la Ser-1177 et une phosphorylation de la Thr-497, résultant en une atténuation de l'activité enzymatique. De plus, le processus de

déphosphorylation est induit par les phosphatases PP2A et PP1 agissant sélectivement sur les Ser-1177 et Thr-497, respectivement (Michell B.J. *et al.*, 2001).

1.3.6.5 Protéine inhibitrice des NOS (PIN)

L'extrémité N-terminale de nNOS contient un site de liaison pour la protéine PIN de 89 acides aminés (Jaffrey S.R. *et al.*, 1996). La spectroscopie par RMN a été utilisée pour cartographier la région de liaison de PIN sur la nNOS de rat à Met²²⁸-His²⁴⁴ (Fan J.S. *et al.*, 1998) et de déterminer que PIN se lie à nNOS avec une stœchiométrie 1:2 pour PIN : nNOS. Par contre, il existe une contradiction dans la littérature sur la capacité de PIN à inhiber l'activité des NOS. Certaines études suggèrent que seulement nNOS s'associe avec PIN et que cette association inhibe l'activité de la nNOS en la déstabilisant (Jaffrey S.R. *et al.*, 1996). Par contre, de récentes découvertes montrent que PIN n'inhibe pas la nNOS et n'induit pas sa monomérisation (Rodriguez-Crespo I. *et al.*, 1998). De plus, PIN n'a pas d'effet sur la dimérisation de nNOS mais inhibe les NOS et l'activité oxydase du NADPH de nNOS, eNOS et iNOS de façon temps-dépendant (Hemmens B. *et al.* 1998).

1.3.6.6 Protéine de choc thermique (HSP90)

La chaperone moléculaire HSP90 a été identifiée comme régulatrice de l'activité de eNOS, possiblement d'une façon allostérique (Garcia-Cardena G. *et al.*, 1998). L'activation par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), l'histamine ou la force de cisaillement dans les cellules endothéliales humaines augmente l'interaction entre eNOS et HSP90 et augmente l'activité de eNOS d'approximativement 3 fois. L'activité de eNOS purifiée est aussi augmentée par HSP90 purifiée, suggérant une interaction directe entre les deux protéines. Les détails de cette interaction ne sont pas encore élucidés. Une protéine identifiée pouvant interagir

avec eNOS, la protéine-1 associée avec eNOS (ENAP-1) est une protéine de 90 kDa qui est phosphorylée sur tyrosine en réponse à une stimulation avec la bradykinine dans les cellules endothéliales de bovin (Venema V.J. *et al.*, 1996). Des chercheurs ont démontré que ENAP-1 est en fait HSP90 (Harris M.B *et al.*, 2000). Récemment, des hétéro-complexes nNOS- HSP90 ont été détectés (Bender A.T. *et al.*, 1999). La nNOS n'a pas directement été activée par HSP90 *in vitro*. Il a été suggéré que le HSP 90 joue un rôle dans l'incorporation du hème dans le nNOS *in vitro*.

On croyait que le iNOS est régulée au niveau de la transcription mais l'identification d'une protéine interagissante avec iNOS dans le système nerveux central a été récemment reportée. KARILIN semble inhiber iNOS en prévenant la formation de dimères de iNOS (Ratovitski E.A. *et al.*, 1999) et semble jouer un rôle neuroprotecteur durant l'inflammation.

1.3.7 Inhibiteurs des NOS

La régulation pharmacologique de la synthèse du NO peut être obtenue en utilisant des analogues de la L-arginine (voir Tableau I) tels que la N^ω-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) (Moncada S. *et al.*, 1993), le N^ω-nitro-L-arginine (L-NA), le N^ω-nitro-L-arginine méthylester (L-NAME) lesquels agissent comme des inhibiteurs non-sélectifs des NOS (Rees D.D. *et al.*, 1990; Moncada S. *et al.*, 1997). L'inhibition sélective de la iNOS peut être effectuée à l'aide de l'aminoguanidine (Corbett J.A. *et al.*, 1992) et celle de la nNOS par la L-S-méthylthiocitrulline (Me-TC).

Tableau 2- Inhibiteurs des enzymes de synthèse du monoxyde d'azote (NOS)

Composé	Abréviation	Capacité d'inhibition
N ^ω -monométhyl-L-arginine	L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS ¹
N ^ω -nitro-L-arginineméthylester	L-NAME	nNOS = eNOS > iNOS ¹
N ^ω -nitro-L-arginine	L-NA	nNOS = eNOS >> iNOS ²
7-nitroindazole	7-NI	nNOS = eNOS = iNOS ¹
1-(2-trifluorométhylphényl)imidazole	TRIM	nNOS = iNOS >> eNOS ³
L-S-méthylthiocitrulline	Me-TC	nNOS >> eNOS ⁴
N- ^δ -iminoéthyl-L-ornithine	L-NIO	iNOS > eNOS = nNOS ¹
N-(3 Aminométhyl)benzyl)acetamidine	1400 W	iNOS >> eNOS = nNOS ⁵
L-N6-(1-Iminoéthyl)lysine	L-NIL	iNOS > eNOS = nNOS ⁶
Aminoguanidine	---	iNOS > eNOS = nNOS ¹

¹ Moncada, 1997; ² Garvey 1994; ³ Handy 1996; ⁴ Furfine 1994; ⁵ Garvey 1997; ⁶ Moore 1994

1.3.8 Localisation intracellulaire de la eNOS

1.3.8.1 Myristoylation et palmitoylation

eNOS est unique parmi les isoformes NOS car elle est acétylée avec un acide gras saturé myristate et palmitate (Michel T., 1999). La myristoylation de la eNOS est effectuée de façon co-translationnelle sur un résidu glycine en N-terminal sur une séquence consensus spécifique qui n'est pas présente sur la nNOS ou la iNOS. La palmitoylation se retrouve sur deux résidus cystéine Cys¹⁵ et Cys²⁶ près du N-terminal de la eNOS (Liu J. *et al.*, 1995; Liu J. *et al.*, 1997) et sert à stabiliser de façon importante l'association de eNOS avec la membrane. La myristoylation qui est requise pour le ciblage de la eNOS à la membrane des cellules endothéliales (cavéoles)

(Shaul P. *et al.*, 1996) est essentiellement irréversible. Par contre, la palmitoylation de la eNOS est réversible: des agonistes tel que la bradykinine (Robinson L.J. *et al.*, 1995; Prabhakar P. *et al.*, 1998) induisent une dépalmitoylation de la eNOS, fournissant une similarité avec d'autres protéines de signalisation palmitoylées, tel que la protéine $G\alpha_s$ (Wedegaertner P.B. *et al.*, 1995). Le mécanisme de dépalmitoylation représente un mécanisme possible pour la relâche de protéines de signalisation ancrées à la membrane en réponse à une stimulation avec un agoniste. Par contre, le mécanisme régulant le processus de dépalmitoylation n'est pas bien caractérisé.

1.3.8.2 Cavéoline-1 et ou cavéoline-3

eNOS est localisée dans les cavéoles (Shaul P. W. *et al.*, 1996; Garcia-Cardena G. *et al.*, 1996), microdomaines de la membrane plasmique, qui sont impliqués dans une variété de fonctions cellulaires incluant les événements de transduction du signal cellulaire. Les protéines cavéolines sont les protéines majeures formant les cavéoles. L'interaction directe et quantitative des domaines oxygénase ou réductase de la eNOS avec le domaine d'échafaudage de la cavéoline-1 dans les cellules endothéliales (cavéoline-3 dans les cardiomyocytes) (Feron O. *et al.*, 1996; Ghosh S. *et al.*, 1998; Ju H. *et al.*, 1997) à la membrane plasmique préserve la eNOS dans un état inactif mais activable (Garcia-Cardena *et al.*, 1997). La cavéoline liée à la eNOS demeure inactive à moins que la CaM-Ca²⁺ déplace la cavéoline et donc active l'enzyme (Michel J. B. *et al.*, 1997). Un motif de liaison de neuf acides aminés pour la cavéoline a été identifié chez la eNOS bovine (résidus 350-358), et une mutation de ces acides aminés produisent une enzyme active qui ne peut pas être inhibée par la cavéoline-1 (Garcia-Cardena G. *et al.*, 1997). Cavéoline-3 se lie également à la nNOS dans le muscle squelettique, inhibant la synthèse de NO, et cette inhibition est réversible par la CaM/Ca²⁺ (Venema V.J. *et al.*, 1997).

1.3.8.3 Récepteurs et protéines

De façon similaire, l'interaction avec le domaine 4 intracellulaire du récepteur B2 de la bradykinine inhibe eNOS (Ju. H. *et al.*, 1998) (voir Figure 1.5). Après l'activation des cellules endothéliales avec la bradykinine ou avec des ionophores de calcium, eNOS se dissocie de ses complexes et devient active. Cette stimulation peut également promouvoir l'interaction entre la eNOS et canal anion/cation voltage-dépendent (Porine) afin d'augmenter davantage la production de NO (Sun J. *et al.*, 2002). L'activation de la eNOS après stimulation avec le VEGF amène aussi à une réorganisation des complexes entre eNOS et ses protéines de liaison. L'activation « précoce » de la eNOS dépendante du Ca^{2+} est suivie par une activation « tardive » dépendante de la phosphorylation par la protéine kinase B/Akt (Dimmeler S. *et al.*, 1999; Fulton D. *et al.*, 1999) et la protéine kinase A (Butt E. *et al.*, 2000). La protéine de choc thermique 90 (HSP90), qui se lie à la eNOS (Venema V.J., *et al.*, 1996; Garcia-Cardena G. *et al.*, 1998) facilite la dissociation dépendante de la CaM entre la eNOS et la cavéoline (Gratton J.P. *et al.*, 2000) et médie l'interaction entre la eNOS et la protéine kinase B/Akt (Fontana J. *et al.*, 2002; Brouet A. *et al.*, 2001). L'approvisionnement efficace en substrat est assuré par la présence du transporteur d'arginine (CAT1; transporteur d'acide aminé) dans les cavéoles et son interaction directe avec eNOS (McDonald K.K. *et al.*, 1997).

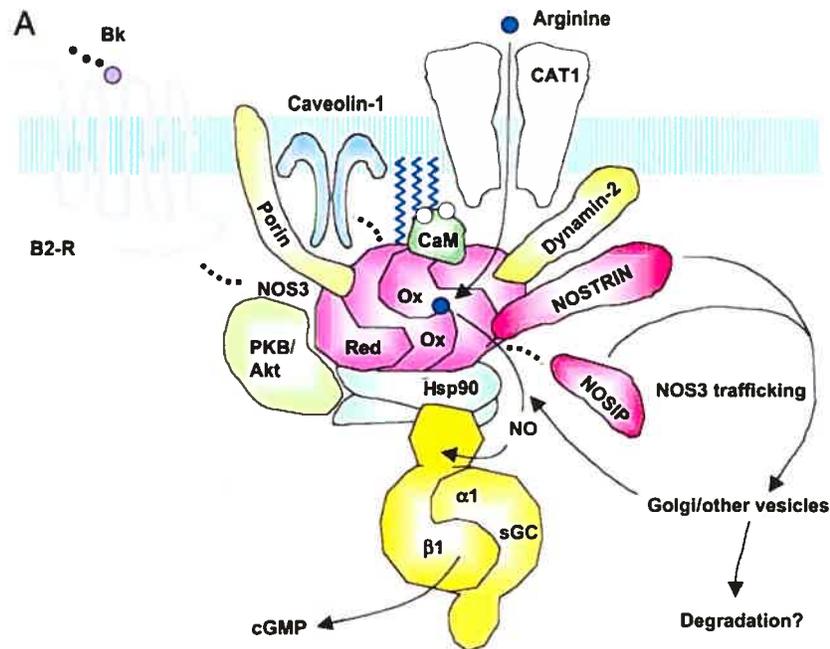


Figure 1.5- Protéines interagissant avec eNOS pouvant réguler son routage dans la cellule⁴.

D'autres protéines tels que dynamin-2 (Cao S. *et al.*, 2001), NOSIP (protéine interagissant avec eNOS) (Dedio J. *et al.*, 2001) ou NOSTRIN (Zimmermann *et al.*, 2002) peuvent être impliquées dans la localisation de l'enzyme dans l'appareil de Golgi et dans d'autres compartiments intracellulaires (voir Figure 1.5). NOSIP se lie à la région C-terminale du domaine oxygénase de la eNOS et induit la translocation de l'enzyme des cavéoles à des sites intracellulaires, résultant en une diminution de la production de NO (Dedio J. *et al.*, 2001). Par ailleurs, des études ont démontré qu'une sur-expression de NOSTRIN dans des cellules ovariennes d'hamster chinois (cellules CHO) induisent une redistribution de la eNOS de la

⁴ Tiré de : Nedvetsky PI, Sessa WC, Schmidt HH. There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 24;99(26):16510-2. Epub 2002 Dec 16.

membrane plasmique au niveau des membranes du golgi ainsi qu'à des structures semblables à des vésicules dans le cytosol (Zimmermann *et al.*, 2002).

1.3.9 Localisation des NOS dans différents organites

1.3.9.1 Dans les membranes plasmiques et les cavéoles

Le ciblage de eNOS dans la fraction membranaire a été découvert lors des premières isolations de l'enzyme, qui ont montré que les détergents sont requis pour la solubilisation de l'enzyme (Pollock J.S. *et al.*, 1991). Par contre, la eNOS ne contient pas de domaine transmembranaire hydrophobe, et l'association de la eNOS avec les membranes cellulaires est médiée principalement par l'acylation de l'enzyme. L'identité de l'organite (s) sub-cellulaire spécifique dans laquelle eNOS est majoritairement présente a été un point de controverse, mais maintenant résolue avec la découverte que eNOS est ciblée dans les cavéoles (Feron O. *et al.*, 1996; Shaul P. W. *et al.*, 1996). Les cavéoles sont des petites invaginations dans la membrane plasmique caractérisées par la présence de cavéolines transmembranaires (Anderson R.G. *et al.*, 1993; Parton R.G. *et al.*, 1996). Les cavéoles représentent une caractéristique importante des membranes plasmiques des cellules endothéliales et sont également présentes dans des myocytes cardiaques et d'autres types cellulaires. Dans plusieurs tissus, les cavéoles peuvent servir comme sites de séquestration pour les molécules de signalisation telles que des récepteurs, des protéines G, des protéines kinases de même que la eNOS. Deux récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs m2 muscarinique et B2 pour la bradykinine sont ciblés dans les cavéoles suite à une stimulation avec leur agoniste respectif (Feron O. *et al.*, 1997; de Weerd W.F. *et al.*, 1997). Ces deux récepteurs initient les cascades de signalisation amenant à la production de NO dans différents types cellulaires incluant les cellules endothéliales et les myocytes. La présence de ces récepteurs dans les cavéoles peut faciliter l'activation de eNOS.

1.3.9.2 Dans le réticulum endoplasmique

Une première étude a démontré que la majorité de l'immunoréactivité de nNOS dans les neurones est associée au réticulum endoplasmique rugueux et dans des structures membranaires des synapses spécialisées (Xia H. *et al.*, 1996). Alors que la synthèse des protéines NOS implique cette organelle, on ne sait pas encore si le réticulum endoplasmique sert comme cible ultime pour les isoformes NOS.

1.3.9.3 Dans l'appareil de Golgi

Une première étude effectuée par Sessa W.C. *et al.* (1995) a montré que la eNOS est associée au Golgi dans des cellules endothéliales en culture et dans des vaisseaux sanguins intacts et que cette association était nécessaire à la synthèse efficace du NO. Par la suite, Fulton *et al.* (2002) ont montré par la microscopie confocale une co-localisation de la eNOS phosphorylée et non phosphorylée dans les régions du Golgi et le plasmalemma chez des cellules transfectées ainsi que dans des cellules endothéliales natives. De plus, le VEGF stimule la production de NO dans la région périnucléaire ainsi que dans les membranes plasmiques de cellules endothéliales. Il semble donc que la eNOS activée (phosphorylée) puisse résider dans deux compartiments cellulaires et amener la production de NO.

1.3.9.4 Dans les mitochondries

Plusieurs études ont montré que des donneurs de NO et administrés à des doses pharmacologiques peuvent inhiber la chaîne respiratoire des mitochondries (Shen W. *et al.*, 1995). Peu de données concluantes suggèrent que les NOS soient présentes dans les mitochondries (Bates T.E. *et al.*, 1996). Quelques études immunohistochimiques ont montré un marquage pour les trois isoformes NOS dans les mitochondries. Il semblerait possible que les

NOS situées dans les mitochondries puissent jouer un rôle dans la phosphorylation oxydative mais ceci doit être confirmé.

Divers systèmes biologiques ont permis de caractériser la NOS mitochondriale (mtNOS), identifiée comme l'isoforme α de la nNOS, acétylée à un résidu Thr ou Ser, et phosphorylé à l'extrémité C-terminale (Haynes V. *et al.*, 2004). Cette enzyme possède les mêmes besoins en cofacteurs et en substrats que les NOS constitutives. Durant des conditions physiologiques, la production de NO par les mitochondrie a un rôle important dans le maintien du métabolisme cellulaire, i.e. moduler la consommation d'oxygène des organelles par l'inhibition réversible et compétitive (avec l'oxygène) du cytochrome c oxidase (Haynes V. *et al.*, 2004 ; Ghafourifar P. *et al.*, 2005)

1.3.9.5 Dans le cytosquelette

Alors que l'enzyme nNOS a été caractérisée au départ comme étant une protéine soluble (cytosolique), il est maintenant clair que cette protéine se lie de façon importante avec le complexe dystrophine du cytosquelette (Brenman J.E. *et al.*, 1995; Brenman J.E. *et al.*, 1996). Cette découverte fournit un exemple où un isoforme de la NOS peut être soumis à une régulation tissu-spécifique par des associations protéines-protéines spécifiques. Des études ont montré également que la eNOS peut s'associer avec des protéines du cytosquelette (Ayajiki K. *et al.*, 1996; Venema V.J. *et al.*, 1996).

1.3.9.6 Dans le noyau

Une première étude a démontré que les NOS peuvent être présent dans les noyaux de cellules endothéliales de bovin en culture (Morin A.M. *et al.*, 1994) . Les enzymes ont été

détectées par la technique de NADPH diaphorase. Par la suite, d'autres études ont montré la présence nucléaire de la eNOS (Feng Y. *et al.*, 1999). Ils ont démontré que le VEGF induit la translocation nucléaire du récepteur du VEGF, le Flk-1/KDR, de la eNOS ainsi que de la cavéoline-1 dans des cellules endothéliales vasculaires. Cette translocation nucléaire semble être un mécanisme pour cibler la production du NO dans le compartiment nucléaire où ce dernier pourrait influencer l'activation de facteurs de transcription. Goetz R.M. *et al.* (1999) ont montré que l'œstrogène peut induire une translocation dépendante du calcium de la eNOS au niveau du noyau. Par la suite, Govers R. *et al.* (2002) ont montré que la eNOS ainsi que la cavéoline-1 sont localisées dans des organites périnucléaires chez les cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC). Cette étude démontre que l'activité de la eNOS n'est pas régulée par la cavéoline 1. Finalement, une étude effectuée par Giordano A. *et al.* (2002) a démontré la présence de la eNOS et de la iNOS dans les noyaux d'adipocytes bruns; la densité et l'activité de ces enzymes seraient modulés par la noradrénaline.

1.4 LE NOYAU COMME ORGANITE

La structure du noyau est composée de deux membranes : une membrane nucléaire externe et une membrane nucléaire interne. Entre les deux membranes se situe un espace périnucléaire. Il a été démontré que la structure de la membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique (Lodish H. *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'enveloppe nucléaire est composée de protéines et de lipides tout comme la membrane plasmique. Le noyau possède également des pores nucléaires, qui relient les deux membranes nucléaires entre elles et qui servent à transporter les molécules entre le cytoplasme et le noyau. Plusieurs éléments signalitiques présents à la surface cellulaire ont été retrouvés également au noyau tels que les canaux Ca^{2+} (Rogue P.J. *et al.*, 1999), les canaux K^+ et Cl^- (Szewczyk A., 1998), les lipides

bioactifs (D'Santos *et al.*, 1998; Cocco L. *et al.*, 2001), les enzymes (Baker R.R. *et al.*, 1996; Schievella A.R. *et al.*, 1995), les récepteurs à 7 domaines transmembranaire (Booz G.W. *et al.*, 1992; Bkaily G. *et al.*, 1997; Bhattacharya M. *et al.*, 1998; 1999; Hornick C.A. *et al.*, 2000; Gobeil F. *et al.*, 2002, 2003; Marrache A.M. *et al.*, 2002) et les facteurs de transcription (Carlotti F. *et al.*, 2000).

1.4.1 Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Plusieurs GPCRs semblent être exprimés au niveau du noyau. Des études ont identifié le récepteur de sous-type AT1 de l'angiotensine dans des noyaux de foie de rat (Booz G.W. *et al.*, 1992; Tang S.S. *et al.*, 1992). Par la suite, d'autres études ont démontré la présence de récepteurs acétylcholine muscarinique dans des cellules de cornée de rat et des cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) (Lind G.J. *et al.*, 1993; 1995). Les récepteurs B1 de la bradykinine (Bkaily *et al.*, 1997) et les récepteurs de l'endothéline-1 (Naik R.D. *et al.*, 1998) ont également été identifiés au niveau du noyau. D'autres GPCRs ont été détectés dans la région périnucléaire tels les récepteurs pour la somatostatine (Hornick C.A. *et al.*, 2000), la substance P (Grady E.F. *et al.*, 1995) et la neurotensine (Castel M.N. *et al.*, 1992; Faure M.P. *et al.*, 1995) en réponse à la stimulation par l'agoniste respectif. Finalement, les récepteurs aux prostaglandines E2 (récepteur de sous-type EP1) ont été détectés dans la région périnucléaire de cellules endothéliales de microvaisseaux porcins, dans des cellules de fibroblastes Swiss 3T3 surexprimant de façon stable les récepteurs EP1 et dans des cellules embryogéniques humaines de rein 293 exprimant la protéine EP1 fusionnée avec la protéine fluorescente verte (Bhattacharya M. *et al.*, 1999). Par ailleurs, ces récepteurs ont été montrés fonctionnels puisqu'ils modulent le calcium nucléaire et la transcription de IEG. D'autre part, le gène constitutif eNOS peut être induit par l'activation de récepteurs EP3 nucléaire couplés aux protéines Gi/o sensibles au PTX (Gobeil F. *et al.*, 2002).

Cette dernière étude illustre pour la première fois des récepteurs nucléaires pour les prostaglandines ayant des rôles distincts de ceux de la membrane plasmique.

1.4.2 Acide lysophosphatidique (LPA) et récepteurs au LPA (LPARs)

L'acide lysophosphatidique (LPA; 1-acyl-2-hydroxyl-*sn*-glycero-3-phosphate) est un phospholipide naturel biologiquement actif. Connue à l'origine comme étant un intermédiaire clé de la synthèse *de novo* de lipides, le LPA est maintenant reconnu comme un médiateur lipidique intracellulaire qui induit plusieurs réponses cellulaires, telles que la prolifération et la différenciation, les changements morphologiques, la chémotaxie, l'agrégation et l'invasion de plusieurs types cellulaires. Chez les humains, les réponses physiologiques induites par le LPA proviennent d'interactions spécifiques avec au moins trois récepteurs identifiés génétiquement et désignés LPA₁, LPA₂, et LPA₃ (anciennement appelés récepteurs EDG₂, EDG₄, et EDG₇, respectivement), qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Chun J. *et al.*, 2002). Un résumé des voies de signalisation induite par le LPA est illustré à la Figure 1.6. Le récepteur du LPA est couplé à des protéines G sensibles au PTX (G_i) et non-sensibles au PTX (G_q). La sous-unité α libre de G_i inhibe directement l'adénylate cyclase, alors que les dimères β semblent médier l'activation des MAPKs via l'intermédiaire d'une protéine tyrosine kinase. Cette dernière cascade signalitique engendre ultimement la prolifération cellulaire. La protéine G_q semble activer la voie de signalisation Rho via la PLC et ceci, de façon indépendante des seconds messagers dérivés des phosphoinositides.

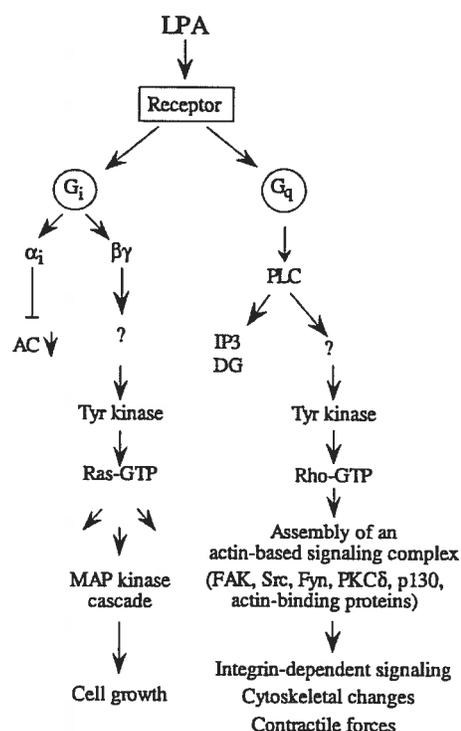


Figure 1.6- Schéma résumant les voies de signalisation induites par le récepteur du LPA. AC, adénylate cyclase; IP₃, inositol trisphosphate; DG, diacylglycérol; PLC, phospholipase C ; PKC, protéine kinase C⁵.

Les mécanismes biochimiques avec lesquels les GPCRs, incluant les LPARs, modulent la transcription des gènes sont complexes et peu élucidés (Pierce K.L. *et al.*, 2001). Quelques mécanismes impliquent l'endocytose du récepteur laquelle serait associée avec une interaction de la c-Src avec la β-arrestine amenant une activation de Ras et des MAPKs à travers une transactivation des récepteurs à tyrosine kinases (RTK) possible déclenchée par des métalloprotéases membranaires (Pierce K.L. *et al.*, 2001). De récentes études ont révélé la

⁵ Tiré de : Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12949-52.

présence du récepteur LPA₁ à l'acide lysophosphatidique dans les noyaux de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porc nouveau-né (PCEC) non-stimulés, dans des cellules HTC4 de rat transfectées de façon stable avec le récepteur LPA₁ ainsi que dans des tissus de foie de rat (Gobeil F. *et al.*, 2003). Le LPA possiblement endogène est en mesure de stimuler l'expression de gène, spécifiquement les gènes pro-inflammatoires cyclooxygénase-2 (COX-2) et l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible (iNOS), à travers un mécanisme qui implique l'activation des récepteurs nucléaires du LPA. Ce dernier récepteur apparaît fonctionnel puisqu'il active la mobilisation du calcium nucléaire ainsi que certaines voies de signalisation impliquées dans la transcription génique.

1.4.3 Calcium nucléaire

Les signaux calciques existent aux noyaux (Figure 1.7). Dans les conditions de repos, la concentration du Ca²⁺ nucléaire est environ de 100-400 nM comparée à la concentration du Ca²⁺ cytosolique qui est de 50-200 nM. (Petersen O.H. *et al.*, 1998; Rogue P.J. *et al.*, 1999). Plusieurs hypothèses pour le mécanisme de transfert du signal généré à la membrane plasmique jusqu'au compartiment nucléaire ont été proposées. Le large diamètre des pores nucléaires suggère que le Ca²⁺ cytosolique puisse diffuser de façon libre du cytosol au noyau. Par contre, en utilisant des indicateurs fluorescents sensibles au calcium et la microscopie confocale, des données démontrent que la concentration du calcium nucléaire peut être plus faible (Waybill M.M. *et al.*, 1991) ou plus élevée que la concentration cytosolique (Przywara D.A. *et al.*, 1991) dépendant du système cellulaire étudié et de l'état physiologique donc un argument contre la diffusion libre du Ca²⁺. Une autre suggestion est la distance entre l'enveloppe nucléaire et le signal du calcium cytosolique qui peut influencer le calcium nucléaire; plus le signal est près de l'enveloppe nucléaire, plus vite il est transmis (Lipp P. *et al.*, 1997) mais le concept d'une signalisation du

Ca²⁺ nucléaire indépendante demeure puisque les signaux du Ca²⁺ cytosolique peuvent être générés sans atteindre l'enveloppe nucléaire. La dernière hypothèse proposée par Rogue P.J. *et al.*, (1999) est que le Ca²⁺ nucléaire provient du noyau exclusivement. La présence de pompes Ca²⁺-ATPase, de récepteurs à ryanodine, des récepteurs IP₃ et IP₄ (Gerasimenko O.V. *et al.*, 1996; Humbert J.P. *et al.*, 1996) et de l'échangeur sodium-calcium (Xie X. *et al.*, 2002) à l'enveloppe nucléaire renforce le concept d'une régulation autonome du Ca²⁺ nucléaire. Le Ca²⁺ nucléaire est relâché de l'enveloppe nucléaire dans le nucléoplasme via des canaux Ca²⁺ opérés par un ligand localisé à la membrane nucléaire interne sensibles à l'IP₃ (Récepteurs IP₃) ou au second messenger adénosine diphosphate ribose cyclique via les récepteurs ryanodine.

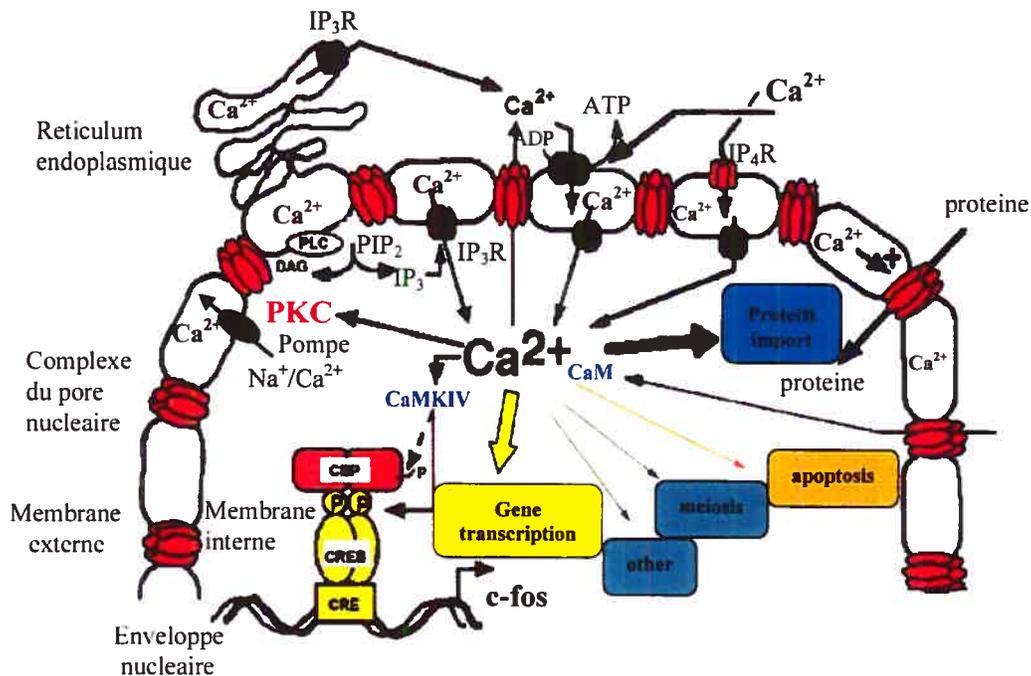


Figure 1.7- Voie de signalisation du calcium dans le noyau⁶. Une membrane externe et une membrane interne forment le noyau. Les pores nucléaires relient ces deux membranes et régulent le mouvement de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme. L'enveloppe nucléaire sert à emmagasiner le calcium nucléaire. À la membrane nucléaire externe se trouve des pompes IP₄ et Ca²⁺-ATPase qui rechargent le calcium dans l'espace inter-membranaire. La membrane interne contient des récepteurs IP₃ qui relâchent le calcium via l'IP₃ et l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ afin de réguler le calcium nucléaire. Le calcium nucléaire joue plusieurs rôles dont la régulation de l'importation de protéines, l'apoptose, la méiose ainsi que la transcription génique. CaM : calmoduline ; CaMKIV : protéine kinase IV dépendante de la calmoduline ; CRE : élément de réponse à l'AMPc ; CREB : facteur de liaison au CRE ; CBP : protéine de liaison à CREB ; DAG : diacylglycérol ; IP₃R : récepteur à l'IP₃ ; IP₄R : récepteur à l'IP₄ ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C.

⁶ Tiré de: Malviya AN, Rogue PJ. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. Cell. 1998 Jan 9;92(1):17-23.

1.4.4 Facteur de transcription NF-kappa B (NF-κB)

Le NF-κB est une molécule de signalisation qui joue un rôle critique dans les réponses inflammatoires et immunitaires (Li Q. *et al.*, 2002). Il est régulé par une famille de protéines inhibitrices, les IκBs. Le modèle classique du fonctionnement du NF-κB dans des cellules au repos est que le NF-κB forme un complexe avec sa sous-unité inhibitrice IκB dans le cytoplasme; suite à une stimulation induisant une phosphorylation du IκB, le NF-κB est relâché et transloque au noyau où il active par la suite des gènes dont les promoteurs possèdent des sites de liaison pour le NF-κB (Karin M. *et al.*, 2000). Le IκB non-dégradé, tout comme le NF-κB, possède un signal de localisation nucléaire (NLS) le permettant alors d'entrer dans le noyau et se ré-associer avec le NF-κB (Sachdev S. *et al.*, 1998; Karin M. *et al.*, 2000). Ces données démontrent que la localisation cytoplasmique du NF-κB dans les cellules au repos n'est pas statique mais résulte plutôt d'un échange de ces sous-unités entre le noyau et le cytoplasme (Carlotti F. *et al.*, 2000). Il est important de souligner que l'activité du NF-κB est dépendante du Ca^{2+} nucléaire (Rogue P.J. *et al.*, 1999).

1.4.5 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

Les mitogen-activated protein kinases (MAPKs) sont une famille de sérine/thréonine protéine kinases qui participent à plusieurs voies de signalisation induites par plusieurs stimuli extracellulaires, incluant les facteurs de croissances. Les trois sous-groupes des MAP kinase de mammifères sont les ERK (Cano E. *et al.*, 1995), les c-Jun NH2-terminal kinase (JNK ; Dérijard B. *et al.*, 1994 ; Davis R. *et al.*, 1994 ; Kyriakis J.M. *et al.*, 1994) et récemment la MAP kinase p38 (Raingeaud J. *et al.*, 1995; Freshney N.W. *et al.*, 1994 ; Han J. *et al.*, 1994). Le groupe des ERKs (connus également en tant que p44 et p42 ; Nishida E. *et al.*, 1993) est typiquement activé

par les facteurs de croissance via une voie de signalisation dépendante de p21^{ras} (Cano E. *et al.*, 1995 ; Raingeaud J. *et al.*, 1995). Les JNK et p38 MAP kinases répondent à des cytokines pro-inflammatoires et au stress externe (Cano E. *et al.*, 1995). Un des rôles des MAP kinases ERK et JNK sont l'activation de la transcription des gènes c-fos et c-jun (Cano E. *et al.*, 1995).

Les GPCRs stimulent des systèmes générant plusieurs seconds messagers tels que l'AMPc et le Ca²⁺ (Gilman A.G., 1987) lesquels peuvent contribuer à la transcription de gènes. Il y a de plus en plus de données expérimentales qui montrent les GPCRs activés monopolisent les enzymes MAPKs cytosoliques pour la phosphorylation de certains facteurs de transcription et amènent à la transcription génique (Pierce K.L. *et al.*, 2001). Un mécanisme récent élucidé pouvant induire la transcription génique fut la découverte des MAPKs dans les noyaux des cellules HeLa, des fibroblastes d'embryon de poulet et dans des fibroblastes 3T3 de souris (Chen R.H. *et al.*, 1992 ; Sanghera J.S. *et al.*, 1992). Les protéines kinases sont présentes dans le noyau dans les conditions basales et peuvent être activées par l'insuline (Kim S.J. *et al.*, 1997). Donc, il existe des mécanismes autres que la translocation de MAPK cytosolique activée pouvant amener à une activation de la MAPK nucléaire. MAPK kinase (MEK), l'enzyme qui phosphoryle les MAPK, contient un NLS à son N-terminal (Garcia-Bustos J. *et al.*, 1991) et serait donc possiblement responsable de l'activation des MAPKs nucléaires.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Il existe certaines évidences que la eNOS peut transloquer au noyau (Feng Y. *et al.* 1999; Goetz R.M. *et al.* 1999; Govers R. *et al.* 2002; Giordano A. *et al.* 2002) et qu'elle peut être active (Giordano A. *et al.* 2002). De plus, le récepteur LPA₁ connu pour être couplé à l'enzyme eNOS (Kou R. *et al.* 2002) a également été retrouvé au niveau nucléaire dans un état opérationnel (Gobeil F. *et al.*, 2003).

Compte tenu de ces évidences, on pourrait proposer comme hypothèse que l'enzyme eNOS existe au niveau nucléaire, qu'elle peut être active au noyau (produire du NO) et que la NO aurait un rôle à jouer dans la transcription génique.

Afin de répondre à cette hypothèse, trois objectifs principaux ont été élaborés :

1) Démontrer la présence nucléaire de la eNOS ; 2) Mesurer l'activité de la eNOS nucléaire en réponse à la stimulation avec le LPA ; 3) Identifier les mécanismes biochimiques pouvant être activés par le NO et qui participent à la transcription génique. Les approches expérimentales sont multidisciplinaires et ont été effectuées chez différents systèmes cellulaires ainsi que chez une suspension de noyaux isolés. Afin de répondre au premier objectif, nous avons utilisés des cellules COS-1 transfectées avec le gène eNOS couplé à la protéine fluorescente verte (GFP) ainsi que des cellules endothéliales de la microvaisseaux cérébraux de porc nouveau-né (PCEC) que nous avons stimulées avec le LPA. La microscopie confocale a été utilisée afin d'étudier la translocation nucléaire de la eNOS. Par la suite, des études en microscopie électronique et d'immunobuvardage de type western ont été effectuées sur des tissus de foie de rat intacts et fractionnés afin de déterminer la localisation subcellulaire de la eNOS et la GCs plus spécifiquement dans les organites nucléaires. Dans le but d'étudier l'activité de la eNOS nucléaire, des expériences de mesure de la production de nitrites ainsi que des études de

phosphorylation de la eNOS ont été entreprises. L'activité de la GCs nucléaire a également été étudiée en mesurant la production de GMPc en réponse à un stimulus. Finalement, afin d'identifier les mécanismes biochimiques nucléaires misent en jeu par le NO, nous avons étudié le rôle du NO dans la mobilisation du calcium nucléaire par microscopie confocale, et par la technique de FURA-2AM, dans l'activation des MAPK nucléaires par la technique d'immunobuvardage ainsi que dans la transcription génique de gènes pro-inflammatoires par la technique de RT-PCR.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Réactifs chimiques et anticorps

Les réactifs chimiques ont été obtenus des compagnies suivantes : acide lysophosphatidique stéroyl (LPAs) (Avanti Polar Lipids Inc., Birmingham, AL); fura-2-AM, KT5823, PD98059 (Calbiochem); SK&F96365 (BIOMOL); fluo-4-AM (Molecular Probes); sodium nitroprusside (SNP), EGTA, BAPTA-AM, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), ammonium pyrrolidine-dithiocarbamate (PDTC), N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), creatinine phosphate, creatine phosphokinase (CPK), L-arginine, (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride ((6R)-BH₄), calmodulin de cerveau bovin (CaM), flavine adenine dinucleotide (FAD), nitrate reductase (NAD[P]H) de *Aspergillus niger* (NR) (Sigma); guanosine 5' triphosphate (GTP) (Amersham Biosciences); NADPH (Roche Applied Science). Tous les autres réactifs chimiques ont été obtenus de Fisher Scientific (Montréal, Québec, Canada).

Les anticorps et leurs sources sont: anticorps anti-eNOS/NOS Type III monoclonal et polyclonal, anticorps anti-iNOS monoclonal, anticorps anti-nNOS monoclonal (Transduction Laboratories); anticorps anti-guanylate cyclase soluble polyclonaux (Cayman et Fabgennix Inc.); anticorps anti-phospho-MAPK (p-ERK1/2) polyclonal (Promega); anticorps anti-MAPK (ERK1/2) polyclonal, anticorps anti-eNOS phosphorylé monoclonal (Ser 1177) (Upstate Biotechnology), IgG de chèvre anti-lapin conjugué à un Alexa-Fluor 594 (Molecular Probe).

2.2 Animaux

Les expériences avec les animaux et les protocoles expérimentaux ont été effectués en accord avec les règlements du Comité de Soins des Animaux du Conseil Canadien et approuvés par le Comité de Soins des Animaux de l'Hôpital Ste-Justine. Les expériences ont été effectuées sur des hépatocytes isolés de foie et de foie intact de rat adulte mâle Sprague Dawley (Charles River, Québec, Canada).

2.3 Fractionnement cellulaire et isolation nucléaire

Le fractionnement cellulaire et l'isolation des noyaux de foie de rat ont été effectués par ultracentrifugation différentielle sur un gradient de sucrose tel que décrit précédemment (Gobeil F. *et al.*, 2003). La pureté des fractions subcellulaires a été validée par des techniques biochimiques, immunologiques et de structures telle que démontrée dans plusieurs publications de notre laboratoire (Gobeil F. *et al.*, 2002; 2003). Les fractions nucléaires préparées démontrent une activité spécifique faible de l'enzyme de la membrane plasmique 5'-nucléotidase (2%), une absence d'immunoréactivité avec des anticorps spécifiques aux organites tel que l'enzyme alcaline phosphatase et cytochrome C, une forte immunoréactivité pour les lamines A/C, comme antigènes marqueurs de la membrane plasmique, des mitochondries (et cytosol) et noyaux, respectivement. La pureté de la fraction nucléaire et l'intégrité des noyaux ont été confirmées par la technique de microscopie électronique (Gobeil F. *et al.*, 2002; 2003).

2.4 Culture cellulaire et transfection

Les cellules endothéliales primaires, obtenues de microvaisseaux cérébraux de porc nouveau-né (PCEC) (Dumont I. *et al.*, 1999) et les cellules COS-1 ont été mise en culture (Gobeil, F. *et al.*, 2003; An S. *et al.*, 1998). Les cellules COS-1 ont été transfectées avec l'ADNc

pour eNOS-GFP (fournis généreusement par le Dr. J.P. Gratton, IRCM, Montréal, Canada) en utilisant la lipofectamine.

2.5 Analyse immunocytochimique et confocale

Nous avons mis en culture des cellules sur des lamelles traitées avec de la poly-D-lysine (Fisher Brand) jusqu'à confluence. Les cellules transfectées et les PCEC ont été incubées dans un milieu DMEM sans sérum durant la nuit avant de débiter les expériences. Les cellules ont été par la suite incubées à différents temps (0, 15, 30 et 60 minutes) avec le s-LPA (10 μ M). À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) froid, fixées avec du 4% paraformaldehyde/PBS pour 20 min à la température de la pièce, bloquées et perméabilisées avec du PBS contenant 5% sérum de chèvre, 5% sérum de veau foetal et du Tx-100 [0.1%] pour 10 min à RT. Les cellules PCEC ont été incubées par la suite durant la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-eNOS polyclonal (1:100) dilué avec du PBS, 5% sérum de chèvre et 5% sérum de veau foetal, suivi d'incubation d'une heure à la température de la pièce avec du IgG de chèvre anti-lapin conjugué à un Alexa-Fluor 594 (1:400). Le marquage des noyaux a été effectué par la sonde fluorescente pour nucléotides sytox green (100 nM) ou avec le 4',6-Diamidino-2-phénylindole (DAPI) (300 nM) (Molecular Probes, Eugene, OR) ajouté après l'étape d'incubation avec les anticorps secondaires. Les cellules PCEC et COS-1 ont été examinées avec un microscope confocal Multi Probe 2001 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Comme contrôle négatif, l'anticorps primaire a été omis.

2.6 Immunohistochimie cryomicroscopique et électronique

Les deux procédures ont été effectuées telles que décrits avec quelques modifications mineurs (Gobeil F. *et al.*, 2003). Brièvement, le foie de rat a été perfusé avec 30 mL de saline isotonique à travers la veine porte suivi par une perfusion/fixation avec 300 mL de 4% paraformaldehyde/0.5% glutaraldéhyde/0.1 M tampon sodium cacodylate pH 7.4. Les morceaux de foie de 1 mm³ ont été placés dans le même tampon de perfusion/fixation pour 1 h à 4°C. Les morceaux ont été lavés par la suite avec un tampon de phosphate supplémenté 4% sucrose et avec 2.3 M sucrose pour 30 min à 1 h. Les tissus ont été congelés dans de l'azote liquide puis coupés en sections. Les sections ont été perméabilisées pour 10 min avec 0.1% TX-100 et lavées avec le tampon d'incubation sans le TX-100. Les sections ont été incubées par la suite avec l'anticorps anti-eNOS polyclonal (1:10) suivi par une incubation avec une incubation avec un IgG conjugué avec un anticorps de chèvre anti-lapin (1nm) (1:100). L'immunohistochimie de la sGC a été effectué en cryomicroscopie sur des sections pré-enrobées telle que décrit (Gobeil F. *et al.*, 2003). Les sections ont été incubées avec l'anticorps polyclonal anti-sous-unité β 1 de la GCs (1:10) suivi par une incubation avec un IgG conjugué avec un anticorps de chèvre anti-lapin (10 nm) (1:20) (Sigma Chemical Co.). Les sections ont été contrastées et observées à l'aide d'un microscope à transmission électronique tel que décrit (Gobeil F. *et al.*, 2003). Les contrôles négatifs ont été effectués en omettant les anticorps primaires.

2.7 Analyse par immunobuvardage de eNOS et GCs

Le SDS-PAGE et l'immunobuvardage ont été effectués tels que décrits précédemment avec des modifications mineurs (Gobeil F. *et al.*, 2003). Brièvement, des quantités égales (50 μ g) de fractions de protéines de membrane plasmique (PM), cytosolique (CYTO), noyaux entiers

(WN) et d'enveloppe nucléaire (NE) d'hépatocytes ont été séparées par un gel SDS-PAGE 7.5 % (pour eNOS) ou 9% (pour sGC), et transférées sur des membranes PVDF. Les membranes ont été par la suite bloquées et subséquentement incubées durant la nuit à 4°C soit avec l'anticorps anti-eNOS monoclonal (1:500), anti-iNOS (1:250), anti-nNOS (1:2000) ou avec l'anticorps anti-soluble guanylate cyclase antisérum (1:500). Les membranes ont été par la suite incubées avec les anticorps secondaires horseradish conjugué à la peroxydase et développées tel que décrit (Gobeil F. *et al.*, 2003). Pour les analyses d'immunobuvardage de l'activation de eNOS, des noyaux isolés (200 µg protéines) de foie de rat ont été traités ou non avec du s-LPA (10 µmol/L) à différents temps soient 0, 5, 15 min dans le tampon d'incubation contenant de l'Hepes (25 mM) pH 7.2, KCl (125 mM), K₂HPO₄ (2 mM), MgCl₂ (4 mM) et CaCl₂ (400 nM). Les échantillons ont été congelés dans de l'azote liquide afin de terminer la réaction. Les protéines ont été solubilisées en utilisant le système NUPAGE (Novex/Invitrogen), et migrées sur un gel 7.5 % SDS-PAGE, transférées sur des membranes PVDF et ensuite incubées soit avec l'anticorps anti-phospho-eNOS polyclonal (dilution 1:500) ou avec l'anticorps anti-eNOS monoclonal (dilution 1: 1000) pour fin de normalisation. Les autoradiogrammes ont été scannés et analysés par densitométrie (ImagePro 4+ software).

2.8 Mesure de la production de nitrite dans les noyaux isolés de foie de rat

Les noyaux isolés de foie de rat (15 x 10⁶ noyaux/essai; 400 µg protéines) ont été placés dans un tampon d'incubation (IB) de composition suivante : Tris-HCl (10 mM) pH 7.5, KCl (10 mM), MgCl₂ (3 mM), CaCl₂ (100 nM). De la L-arginine (100 µM), du NADPH (1 mM), du BH₄ (15 µM), de la CaM (1 µM), du FAD (1 µM) et de la NR (80U/L) ont été ajoutés et la solution oxygénée (volume final par échantillon : 500 µl). Les noyaux ont été incubés pour 15 min à 37°C

avec le véhicule (tampon seul) ou avec sLPA (0.1 μM ; 1 μM ; ou 10 μM) avec ou sans l'inhibiteur des enzymes de synthèse du NO, le N(G)-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) ou l'inhibiteur des récepteurs au LPA (LPA_1), le TH-1603 préincubé 10 min avant stimulation. La production de nitrite a été mesurée par chemiluminescence (NO analyzer [Sievers]). La concentration de protéines a été déterminée par l'essai de protéines Bradford utilisant la BSA comme standard. La production de nitrite a été normalisée à l'aide de la concentration de protéines.

2.9 Mesure de la production de GMPc par radio-immunologie dans les noyaux isolés de foie de rat

Les noyaux isolés de foie de rat (100 μg protéines) ont été placés dans le même tampon d'incubation (volume final par échantillon : 50 μl). Les noyaux ont été pré-incubés pour 5 min à 37°C avec 40 μL d'un tampon contenant l'IBMX (1.25 mM), GTP (2.5 mM), la créatinine phosphate (37.5 mM) et la CPK (462.5 U/mL) et stimulés avec du SNP 50 μM en présence ou en absence d'ODQ (0.3 μM). Les niveaux de GMPc dans le surnagant ont été mesurés en utilisant le kit de radioimmunoessai commercial (Amersham) et normalisés par rapport à la concentration de protéines. Le donneur de NO rapide, le SNP (plutôt que le Deta-NONOate) a été utilisé dû à l'instabilité de la suspension nucléaire après de longues périodes d'incubation.

2.10 Mesure des signaux calciques dans les noyaux isolés de foie de rat

Les signaux nucléaires Ca^{2+} ont été mesurés par la technique de fura-2-AM (Gobeil F. *et al.*, 2003). Brièvement, les noyaux isolés ont été incubés avec du fura-2-AM puis stimulés avec du SNP (1, 10, ou 50 μM) avec ou sans les chélateurs de calcium, EGTA (100 μM) et BAPTA-

AM (100 μM), l'iberiotoxine (0.1 μM), la thapsigargine (20 μM), le SK&F96365 (10 μM), l'ODQ (0.3 μM) ou le KT5823 (1 μM) pour 15 min à 37 °C. La concentration de calcium nucléaire a été mesurée par spectrofluorométrie (modèle LS50, Perkin Elmer, UK) (Gobeil F. *et al.*, 2003). Dans une autre série d'expériences, la microscopie confocale a été utilisée pour étudier le mouvement spatio-temporel du Ca^{2+} nucléaire induit par le SNP dans un noyau unique (Gobeil F. *et al.*, 2003).

2.11 Analyse par immunobuvardage des MAP kinases

Les noyaux isolés de foie de rat (50 μg protéines) ont été traités ou non avec le SNP (1 μM) pour 0 à 40 min comme décrit précédemment (Gobeil F. *et al.*, 2003). Dans une autre série d'expériences, les suspensions nucléaires ont été pré-traitées avec ou sans l'ODQ (0.3 μM), le KT5823 (1 μM), le SK&F96365 (10 μM), l'EGTA (100 μM) ou le PD98059 (1 μM) pour 15 min à 37°C avant stimulation avec le SNP (1 μM). Les westerns blots ont été effectués tel que décrit ailleurs (Gobeil F. *et al.*, 2003).

2.12 Essai de transcription de gènes

L'expression de l'ARN nucléaire (ARNn) a été étudiée tel que décrit précédemment (Gobeil F. *et al.*, 2003) avec quelques modifications. Brièvement, des noyaux isolés de foie de rat ont été incubés à 37°C pour 30 min avec le tampon seul (véhicule) ou avec le SNP en présence ou absence de l'ODQ (0.3 μM), le KT5823 (1 μM), l'EGTA (100 μM), le PD98059 (1 μM) ou le PDTC (100 μM) pré-incubés 15 min à 37°C. L'ARN total de noyaux purifiés a été isolé avec le réactif de TriZol en suivant les instructions du manufacturier. L'expression d'ARN nucléaire a été analysée par la technique de RT-PCR tel que décrit précédemment (Gobeil F. *et al.*, 2003).

Brièvement, 1 µg d'ARNn a été rétro-transcrit avec la transcriptase réverse du virus Moloney murine leukemia (Invitrogen) et l'ADNc (100 ng) généré a été amplifié suivant un protocole de 35 cycles (94°C pour 30 s, 57.5°C pour 45 s et 68°C pour 1 min) utilisant la Taq DNA polymérase (Fermentas).

2.13 Liaison du NF-κB à la séquence consensus d'ADN

Les noyaux ont été stimulés avec du SNP (1 µM) pour 1 h et la liaison du NF-κB à sa séquence consensus d'ADN a été effectuée comme décrit en détails précédemment (Marrache A.M. *et al.*, 2002).

2.14 Analyse statistique

Les données ont été analysées par le test ANOVA univarié, suivi par le test de comparaison multiple de Dunnett ou de Tukey-Kramer, selon l'expérience. La signification statistique a été mise à $p < 0.05$. Les données sont présentées comme des moyennes \pm ESM (erreur standard de la moyenne).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Translocation et localisation nucléaire de la eNOS déterminée par immunofluorescence et microscopie électronique

Des expériences en immunofluorescence ont été effectuées en utilisant des cellules COS-1 transfectées avec le gène eNOS-GFP ainsi que dans des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de porc nouveau-né (PCEC) exprimant la protéine eNOS native. Les deux types de cellules expriment le récepteur 1 au LPA (LPA_1) tel que confirmé par la technique du RT-PCR (données non montrées). Les cellules COS-1 et PCEC ont été stimulées avec le sLPA (10 μ M) à différents temps et les cellules ont été fixées et observées au microscope confocale. Au temps 0 min, les cellules ont un marquage de la protéine eNOS en vert (dans les cellules COS-1) ou rouge (dans les cellules PCEC) à la membrane plasmique (Fig. 3.1). Après 15 min de stimulation, il y a une re-localisation significative de eNOS dans des compartiments intracellulaires qui semblent être des vésicules. La détection périnucléaire et intranucléaire est révélée à 30 min et est soutenue après 60 min. L'immunofluorescence n'a pas été détectée dans les cellules COS-1 non-transfecté et en absence d'anticorps primaire anti-eNOS dans les PCECs (données non montrées).

Par la suite, afin d'étudier la présence de eNOS *in situ*, des expériences de marquage «immunogold» ont été effectuées sur des sections de tissu de foie de rat. Le marquage par «immunogold» montre une présence basale de eNOS à la membrane plasmique d'hépatocytes (Fig. 3.1-II A-B). L'enzyme eNOS a également été détectée dans la matrice nucléaire des hépatocytes (Fig.3.1 II-C), dans le cytosol d'un hépatocyte (Fig.3.1 II-D) et d'une cellule endothéliale (Fig.3.1 II-F) ainsi dans le réticulum endoplasmique rugueux (Fig.3.1 II-E).

Figure 3.1- I) Translocation de eNOS au noyau suite à une stimulation avec le LPA

I

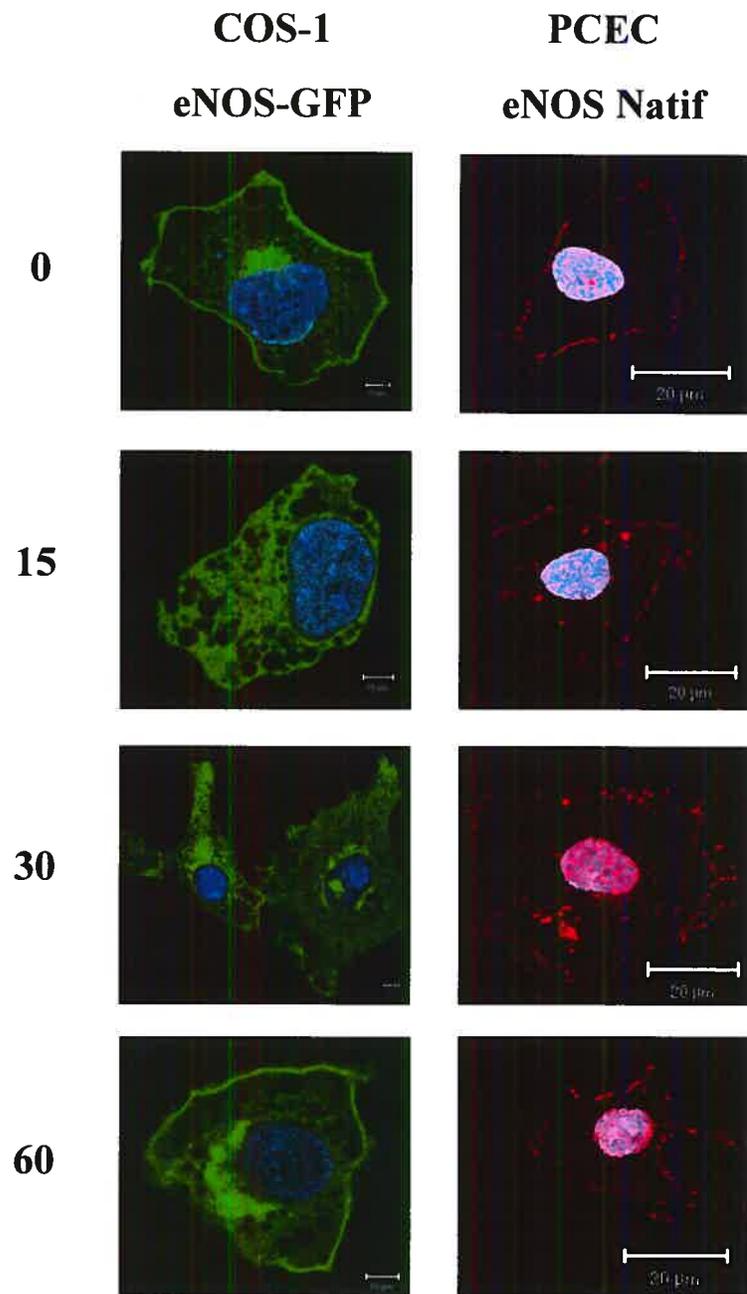


Figure 3.1- I) Translocation de eNOS au noyau suite à une stimulation avec le LPA
Marquage par immunofluorescence de eNOS sur les cellules COS-1 exprimant la protéine de fusion eNOS-GFP ainsi que sur les PCEC perméabilisées exprimant la eNOS native. Les deux types de cellules ont été stimulées avec du s-LPA (10 μ M) pour 0, 15, 30 et 60 min. eNOS-GFP est montré en vert (dans les cellules COS-1) ou en rouge (dans les PCEC) et les noyaux ont été marqués avec le DAPI (bleu) et visualisés par microscopie confocale. On peut observer après 30 min de stimulation avec le LPA, une relocalisation de eNOS de la membrane plasmique aux régions périnucléaires. Échelle = 20 μ m. Les résultats sont représentatifs de trois expériences.

Figure 3.1- II) Détection in situ de eNOS sur des sections de tissus de foie de rat
par microscopie électronique

II

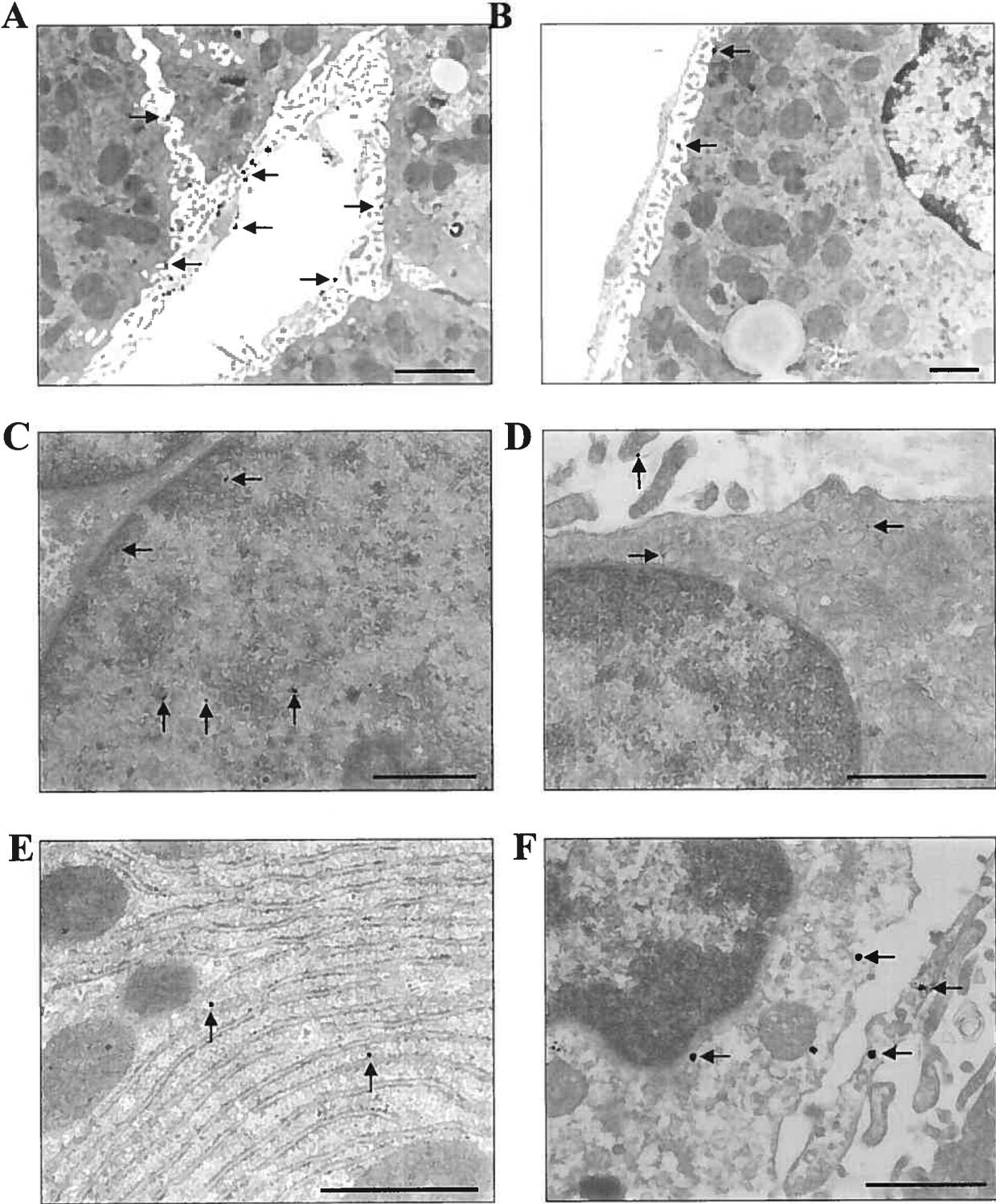


Figure 3.1- II) Détection *in situ* de eNOS dans des sections de tissu de foie de rat par microscopie électronique. **A-B)** Immunoréactivité de eNOS dans les membranes plasmiques détectée par immunogold (flèches). Localisation *in situ* de la eNOS sur des sections de tissu de foie de rat dans le nucléoplasme (**C**) ; dans le cytosol d'un hépatocyte (**D**) et d'une cellule endothéliale (**F**) ; dans le réticulum endoplasmique rugueux (**E**). Les échelles sont de 1 μm .

3.2 Présence périnucléaire et intranucléaire de eNOS et GCs détectée par des analyses d'immunobuvardage de type western blot (pour eNOS et GCs) et par microscopie électronique (pour GCs)

L'immunomarquage des fractions subcellulaires de noyaux de foie de rat avec l'anticorps anti-eNOS monoclonal a révélé une bande immunoréactive à ~ 130 kDa (Fig. 3.2 A) dans les enveloppes nucléaires et dans les noyaux entiers suggérant une présence basale de eNOS dans les régions périnucléaires et intranucléaires du noyau. Des expériences d'immunomarquage de fractions subcellulaires de noyaux de foie de rat avec l'anticorps anti-iNOS monoclonal ou l'anticorps anti-nNOS monoclonal ont montré que ces deux enzymes ne sont pas présentes dans le noyau (données non montrée). Afin de déterminer si le NO dérivé de l'enzyme eNOS nucléaire pouvait agir sur une guanylate cyclase soluble nucléaire, des analyses en immunobuvardage de type western blot ont été effectuées avec des fractions subcellulaires de noyaux de foie de rat avec l'anticorps polyclonal anti-GCs de la sous-unité $\beta 1$. Une bande immunoréactive à ~ 70 kDa (Fig.3.2A) dans les enveloppes nucléaires ont montré une présence basale de la GCs dans les noyaux de foie de rat. Des expériences en cryomicroscopie avec des tissus de foie de rat ont confirmé la présence basale de la GCs au niveau de la matrice nucléaire des noyaux d'hépatocytes (Fig. 3.2 B).

Figure 3.2- Distribution subcellulaire des protéines eNOS et GCs

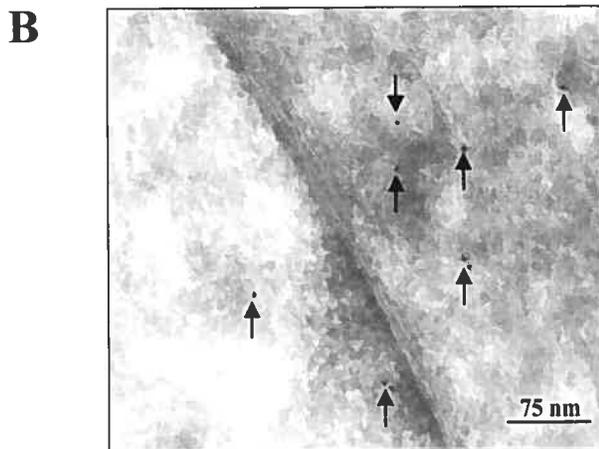
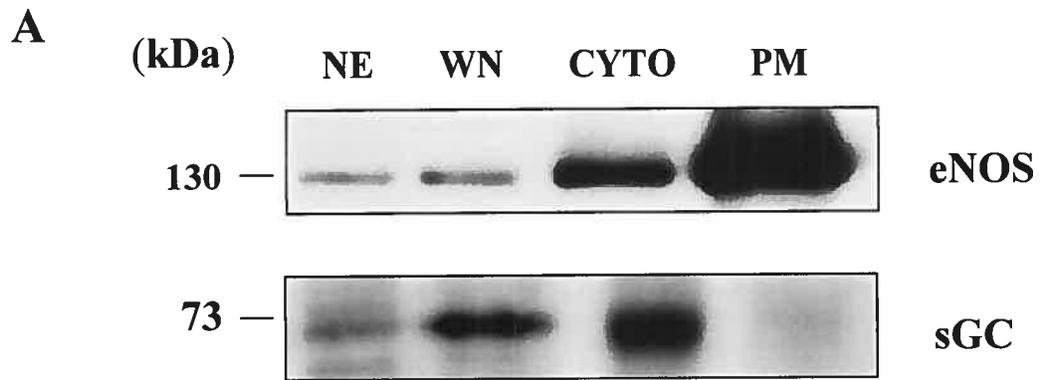


Figure 3.2- Distribution subcellulaire des protéines eNOS et GCs. A) Immunobuvardage de type western blot de eNOS et GCs dans différents organites provenant d'hépatocytes de rat. Les protéines ont été extraites des membranes plasmiques (PM), de la fraction cytosolique (CYTO), de l'enveloppe nucléaire (NE) ou des noyaux entiers (WN). Des quantités égales de protéines dénaturées (50 µg) de ses fractions ont été migrées sur gel 7.5% SDS-PAGE (pour eNOS) ou 9% (pour GCs), transférées sur des membranes PVDF et probées pour la eNOS en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-eNOS ou un anticorps polyclonal de lapin anti-sGC.

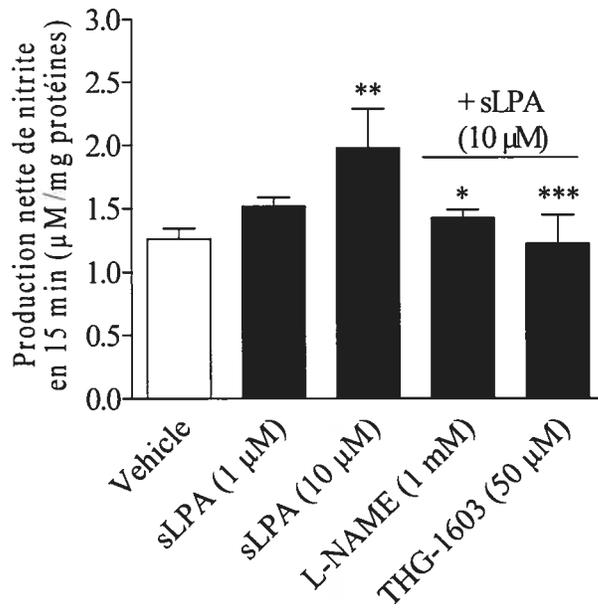
B) Localisation *in situ* de la GCs nucléaire dans des sections de tissu de foie de rat par cryomicroscopie. L'immunoréactivité de la GCs présentée dans le noyau est indiquée par une flèche.

3.3 Activité nucléaire de la eNOS mesurée à l'aide de la production de nitrite et à l'aide de la phosphorylation de la eNOS nucléaire induite par le LPA dans les noyaux isolés de foie de rat

Afin de déterminer si la eNOS nucléaire est active, on a mesuré la production de nitrite dans des noyaux isolés de foie de rat. Puisque les récepteurs LPA₁ ont été découverts antérieurement au niveau des noyaux d'hépatocytes (Gobeil F. *et al.*, 2003), nous avons voulu tester si l'enzyme eNOS pouvait être activée par le sLPA. Tel que montré à la Figure 3.3 A, une stimulation des noyaux avec le sLPA (1 μ M et 10 μ M) augmente la production de nitrite de façon dose-dépendante. Lorsque le L-NAME est utilisé, la production de nitrite est complètement bloquée, suggérant que la production du NO nucléaire provient de l'activité de la eNOS puisque les enzymes iNOS et nNOS n'ont pas été retrouvées au noyau. Finalement, lorsqu'on utilise un inhibiteur des récepteurs LPA₁, le THG-1603, la production de nitrite est abolie (Fig. 3.3 A). L'activité de l'enzyme eNOS nucléaire a également été étudiée à l'aide d'expériences de phosphorylation sur le résidu Ser1177. Des noyaux isolés de foie de rat ont été stimulés avec du sLPA (10 μ M) pendant 0, 5 et 15 min, et des expériences d'immunobuvardage de type western blot ont été effectuées en utilisant soit l'anticorps polyclonal anti-P-eNOS ou l'anticorps monoclonal anti-eNOS afin d'établir un ratio des protéines de eNOS-P/eNOS total. Les ratios nous démontrent qu'après 5 min de stimulation avec le sLPA, il y a une phosphorylation d'environ 2.0 ± 0.2 fois alors qu'à 15 min de stimulation, cette phosphorylation est maintenue à 1.8 ± 0.2 . À l'aide de ces deux types d'expériences, nous pouvons conclure que la eNOS nucléaire est fonctionnelle et peut produire du NO.

Figure 3.3- Activité nucléaire de la eNOS mesurée à l'aide de la production de nitrite et à l'aide de la phosphorylation de la eNOS nucléaire induite par le LPA dans des noyaux isolés de foie de rat

A



B

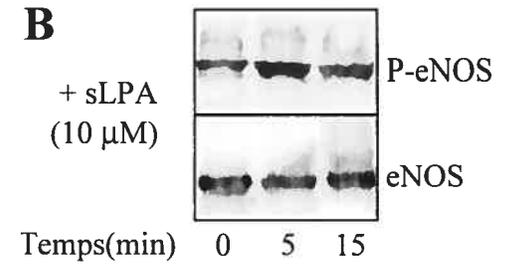


Figure 3.3- Activité nucléaire de la eNOS mesurée à l'aide de la production de nitrites et à l'aide de la phosphorylation de la eNOS nucléaire induite par le LPA dans les noyaux isolés de foie de rat **A)** Activité nucléaire de eNOS dans des noyaux isolés de foie de rat. La production de nitrite nette a été mesurée par chemiluminescence (NO analyzer [Sievers]) dans des noyaux de foie de rat isolés placés dans un tampon d'incubation et stimulés avec du sLPA avec ou sans l'inhibiteur de l'enzyme de synthèse du NO, le N(G)-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) et avec ou sans l'inhibiteur du récepteur au LPA (LPA₁), le THG-1603. Les données sont des moyennes ± E.S.M. de trois expériences séparées. **, $p < 0.01$ *versus* effet du véhicule; *, $p < 0.05$ et ***, $p < 0.001$ *versus* effet de sLPA 10 μ M. Test ANOVA univarié suivi par un test de comparaison multiple Tukey. **B)** Les immunobuvardages à droite illustrent la phosphorylation de eNOS dans des noyaux isolés stimulés avec du sLPA pendant 0, 5 et 15 min. Les données sont des moyennes ± E.S.M. de trois expériences séparées. Test ANOVA univarié suivi par un test de comparaison multiple Tukey.

3.4 Activité nucléaire de la GCs mesurée à l'aide de la production de GMPc dans les noyaux isolés de foie de rat

Nous avons voulu déterminer par la suite si la GCs découverte au noyau pouvait être activée par le NO et produire du GMPc. Des noyaux isolés de foie de rat ont été stimulés avec du SNP et la production de GMPc a été mesurée à l'aide d'une expérience de radioimmunoessai. Tel que montré à la Figure 3.4, le SNP induit une production de GMPc de façon dose-dépendante. De plus, en utilisant l'inhibiteur spécifique de la GCs, l'ODQ, cette production de GMPc induite par le SNP est bloquée (Fig 3.4). On peut donc conclure que la GCs nucléaire peut être activée par le NO produit localement.

Figure 3.4- Activité nucléaire de la GCs déterminée par la mesure de la production de GMPc dans les noyaux isolés de foie de rat

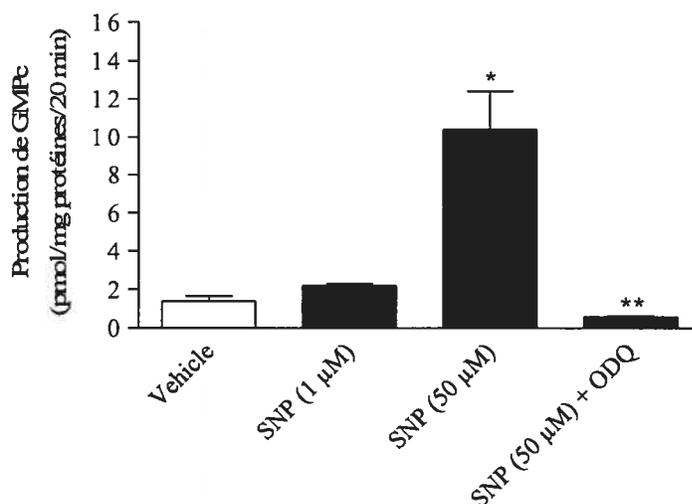


Figure 3.4- Activité nucléaire de la GCs déterminée par la mesure de la production de GMPc dans les noyaux isolés de foie de rat. Les noyaux ont été stimulés avec du SNP en absence ou en présence de l'inhibiteur de la GCs, l'ODQ (0.3 μ M). Les données sont des moyennes \pm E.S.M de trois expériences séparées. *, $p < 0.01$ comparé au véhicule, **, $p < 0.01$ comparé au SNP (50 μ M) seul. Test ANOVA univarié, suivi par un test de comparaison multiple Tukey.

3.5 Le NO induit la mobilisation nucléaire du Ca²⁺

Le calcium nucléaire peut réguler plusieurs processus incluant la transcription génique (Gobeil, F. *et al.*, 2003). Nous avons voulu savoir si le NO pouvait induire des changements dans le Ca²⁺ nucléaire par des méthodes d'imageries en temps réel à l'aide de la microscopie confocale et de sondes sensibles au Ca²⁺ (fluo-4-AM et fura-2-AM respectivement). La mobilisation rapide du Ca²⁺ nucléaire a été visualisée dans un noyau isolé (Fig. 3.5 A). Les images de différentes sections d'un même noyau illustrent le mouvement de transition du Ca²⁺ à l'intérieur du noyau en réponse au SNP (Fig. 3.5 B). Finalement, à l'aide de la méthode fura-2-AM utilisant un spectrofluoromètre, nous avons pu étudier les voies de signalisation impliquées dans la mobilisation du Ca²⁺ nucléaire par le NO. L'incubation de noyaux isolés de foie de rat avec le SNP a induit une mobilisation calcique dose-dépendante (Fig. 3.5 C) pouvant être bloquée par des chélateurs du Ca²⁺, l'EGTA et BAPTA-AM, un bloqueur de canal calcique, le SK&F96365, ainsi que par un inhibiteur de la GCs, l'ODQ et l'inhibiteur de la PKG, le KT5823, suggérant une voie de signalisation impliquant la GCs/PKG.

Figure 3.5- SNP induit une mobilisation du calcium dose-dépendante dans les noyaux isolés de foie de rat

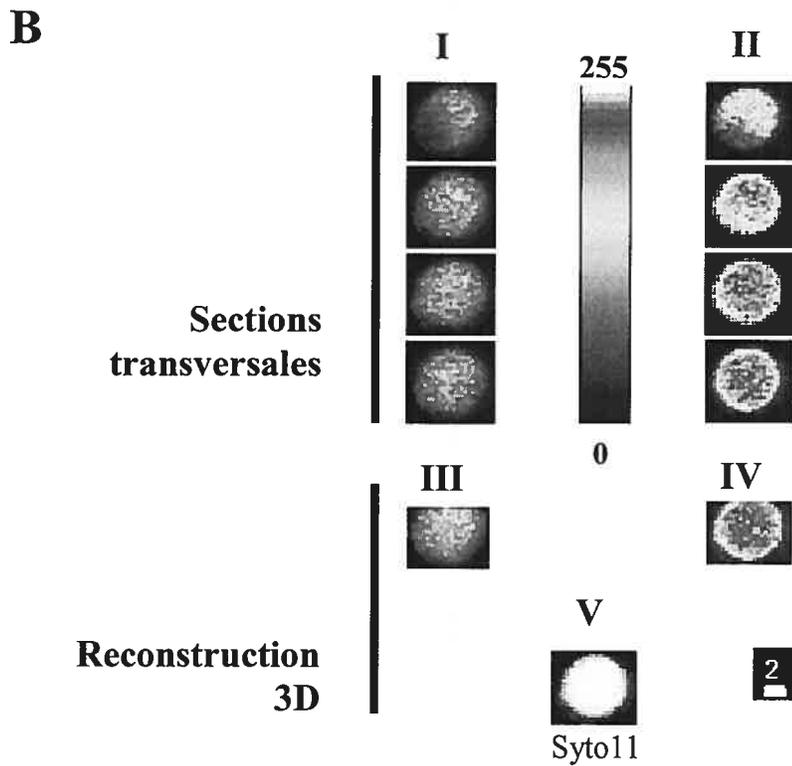
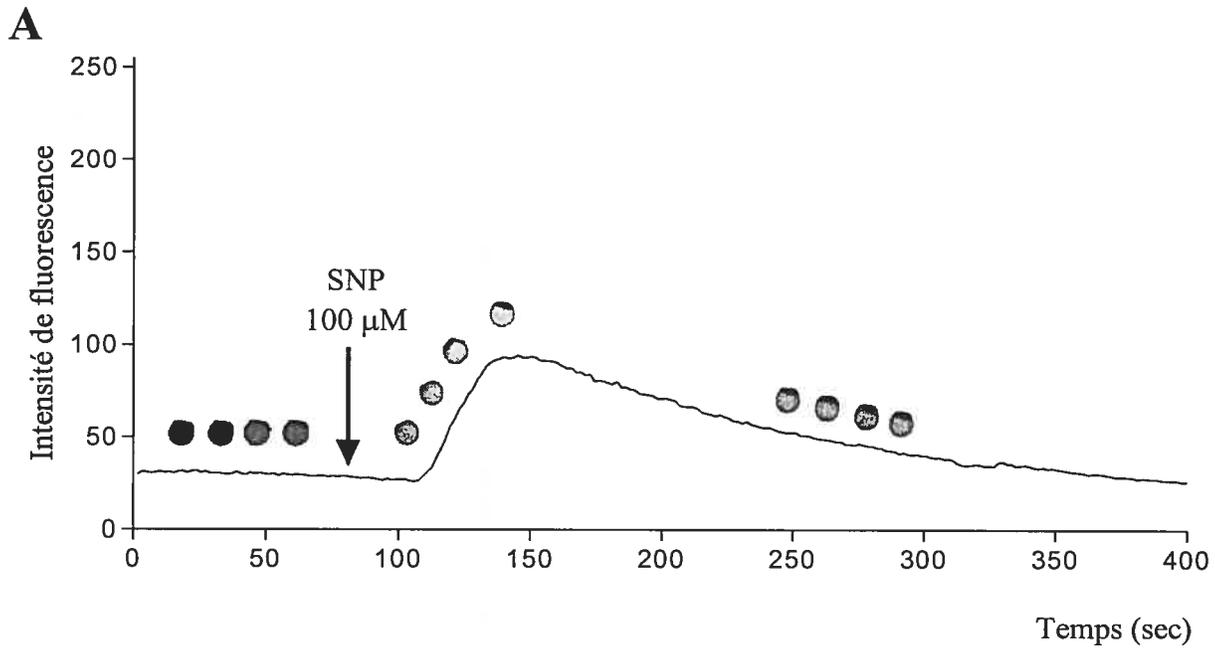


Figure 3.5- SNP induit une mobilisation du calcium dose-dépendante dans les noyaux isolés de foie de rat (suite)

C

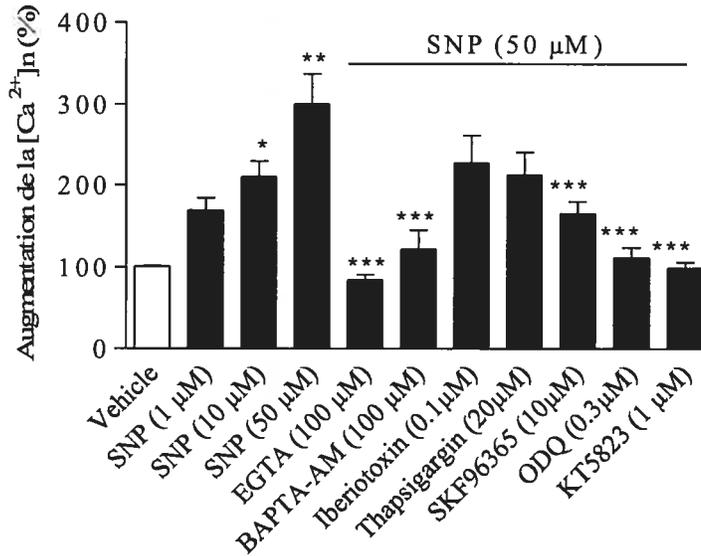


Figure 3.5- SNP induit une mobilisation du calcium dose-dépendante dans les noyaux isolés de foie de rat. **A)** Calcium intranucléaire induit par le NO dans un noyau isolé de foie de rat marqué avec la sonde fluorescente fluo-4-AM et mesuré par microscopie confocale. L'échelle de pseudo-couleurs représente l'intensité de fluorescence de 0 à 255 pour le calcium. Noter: l'intensité de fluorescence du calcium obtenue par microscopie confocale a été automatiquement convertie en valeur numérique à l'aide du logiciel «Molecular Dynamics». Les images sont représentatives de trois expériences séparées. **B)** Différentes sections d'un même noyau ont été prises et ce faisant on peut apprécier clairement les mouvements de Ca^{2+} à travers le noyau en réponse au SNP. **C)** Les signaux calciques ont été obtenus de noyaux de foie de rat marqués avec la sonde fluorescente fura-2-AM et détectés par un spectrofluoromètre. Les données sont des moyennes \pm E.S.M de quatre expériences séparées. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$ *versus* véhicule, ***, $p < 0.001$ *versus* effet du SNP (50 μ M). Test ANOVA univarié suivi par un test de comparaison multiple Tukey.

3.6 Le NO active les MAPKs nucléaire

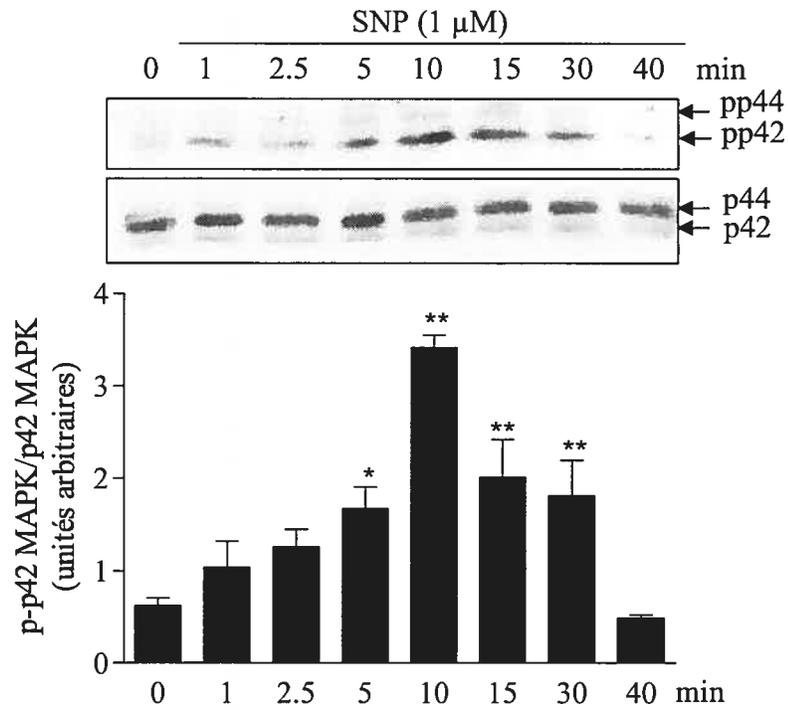
Par la suite, nous avons voulu examiner la phosphorylation de ERK1/2 dans des noyaux isolés de foie de rat en réponse au SNP (1 μ M). Tel qu'illustré dans la Figure 3.6 A, le SNP stimule une augmentation temps-dépendant de la phosphorylation de la p42 MAPK, où le pic est atteint après 10 min de stimulation. Par ailleurs, les niveaux totaux d'ERK1/2 sont restés stables durant l'expérience. Afin d'étudier la voie de signalisation impliquée dans la phosphorylation de la p42 MAPK, des inhibiteurs ont été utilisés (Fig. 3.6 B). Nous avons constaté que cette phosphorylation (et donc l'activation) est dépendante de la GCs, de la PKG ainsi que du Ca^{2+} . De plus, cette activation a été bloquée par l'inhibiteur des MEK, le PD98059 (Fig. 3.6 B).

3.7 Le NO induit la transcription du gène iNOS par un mécanisme dépendant du Ca^{2+} nucléaire, de la voie GCs/PKG nucléaire, des MAPKs et du NF- κ B

Finalement, une incubation des noyaux isolés de foie de rat avec le SNP [1 μ M]a induit la transcription du gène iNOS de façon dose-dépendante (Fig. 3.7 A), et cette transcription était dépendante de la GCs, de la PKG, du Ca^{2+} , des ERK1/2 ainsi que du NF- κ B (Fig. 3.7 B) concordant avec les expériences de mobilisation du calcium nucléaire (voir Fig. 3.5 B). De plus, la stimulation des noyaux avec le SNP (1 h) a augmenté la liaison spécifique du NF- κ B à sa séquence consensus d'ADN (Fig. 3.7 C). L'inhibiteur du NF- κ B, le PDTC, a bloqué la transcription de iNOS induite par le SNP dans les noyaux isolés (Fig. 3.7 B).

Figure 3.6- Activation de la voie de signalisation des MAPKs par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat

A



B

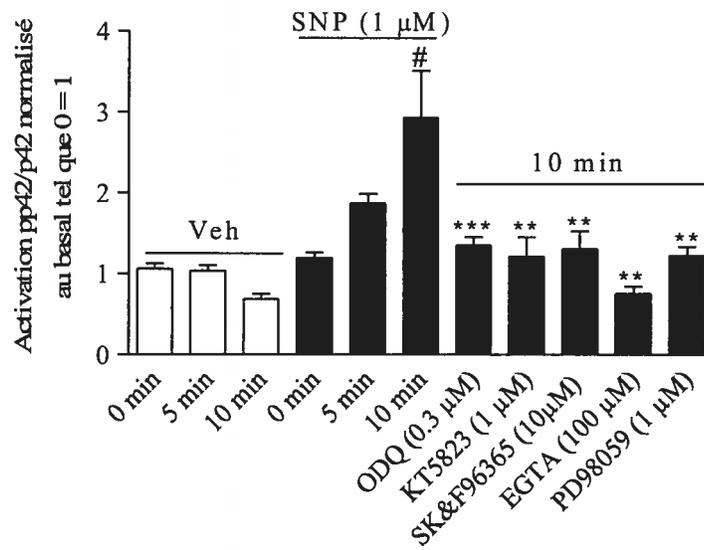
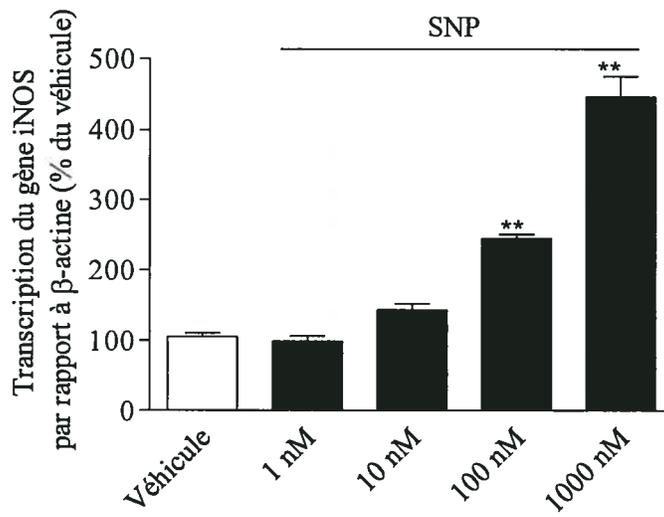
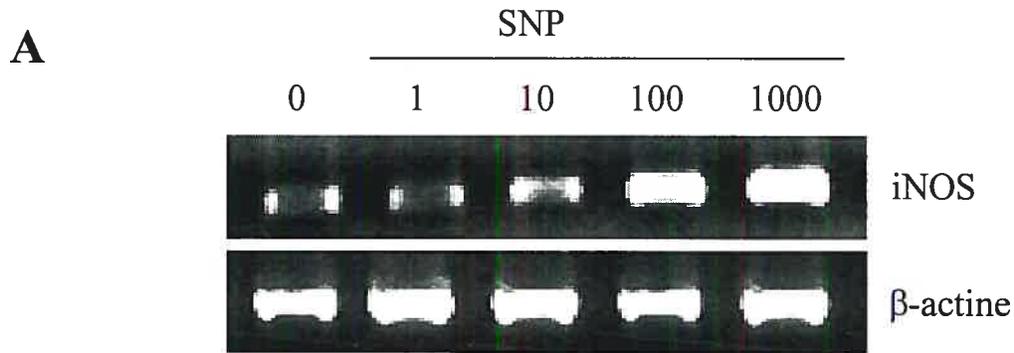


Figure 3.6- Activation de la voie de signalisation des MAPKs par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat. **A)** Cinétique de la phosphorylation de la MAPK p42. Noter une phosphorylation prononcée de la MAPK p42 à 10 min. MAPK totaux (MAPK p44, p42) n'ont pas changé au cours de l'expérience. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ *versus* effet de 0 min. Test ANOVA univarié suivi par un test de comparaison multiple Dunnett (trois expériences différentes). **B)** Phosphorylation de la MAPK p42 est dépendante de la GCs, le PKG et le calcium. Les données sont des moyennes \pm E.S.M de trois expériences. # $p < 0.001$ *versus* SNP 0 min, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ *versus* effet du SNP 10 min. Test ANOVA univarié suivi par un test de comparaison multiple Tukey.

Figure 3.7- Effecteurs impliqués dans la transcription du gène iNOS induite par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat



B

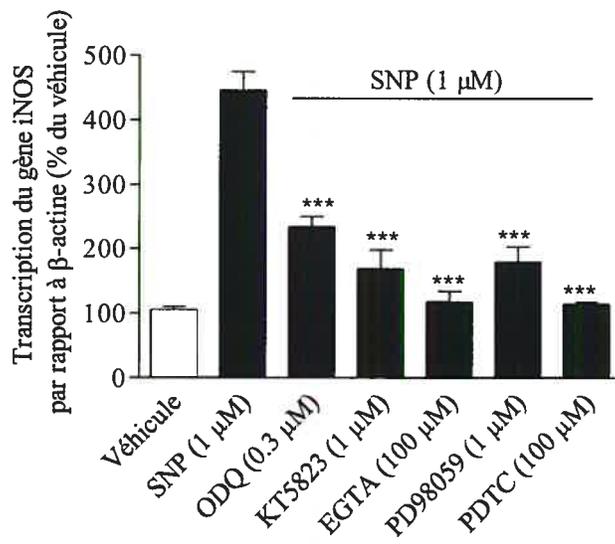


Figure 3.7- Effecteurs impliqués dans la transcription du gène iNOS induite par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat (suite)

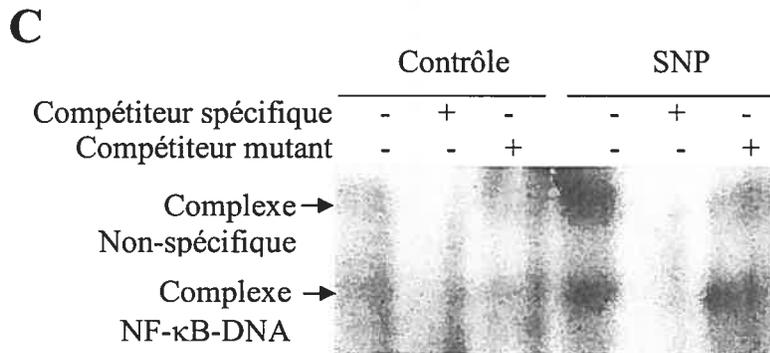


Figure 3.7- Effecteurs impliqués dans la transcription du gène iNOS induite par le SNP dans les noyaux isolés de foie de rat. **A)** Effet dose-dépendant du SNP et **B)** Expression du gène iNOS induite par le SNP. L'expression a été déterminée par la technique de RT-PCR. **, $p < 0.01$ *versus* véhicule (A), ***, $p < 0.001$ *versus* effet du SNP 1 μ M (B). Test ANOVA univarié suivi par un test de comparaison multiple Dunnett (A) ou par un test de comparaison multiple Tukey (B). **C)** Liaison du NF- κ B à l'ADN en réponse à une stimulation nucléaire avec le SNP. SNP induit une augmentation marquée de la liaison (en absence de compétiteurs); excès de la séquence consensus froide (compétiteur spécifique) bloque la liaison alors qu'une séquence mutante bloque uniquement la liaison non-spécifique.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'enzyme eNOS est habituellement exprimée à la membrane plasmique (Pollock J.S. *et al.*, 1993; Hecker M. *et al.*, 1994) ou exclusivement dans les caveolae (Shaul P.W. *et al.*, 1996; Feron O. *et al.*, 1996). Durant ces dernières années, plusieurs études ont montré que l'enzyme pouvait se retrouver dans l'appareil de Golgi (Sessa W.C. *et al.*, 1995; Liu J. *et al.*, 1997) et plus récemment, près du noyau (Feng Y. *et al.*, 1999; Goetz R.M. *et al.*, 1999; Govers R. *et al.*, 2002; Gilchrist M. *et al.*, 2004). Une fonction possible du NO produit directement au noyau peut être la modulation de l'expression des gènes. La localisation et la migration des isoformes NOS au noyau peut fournir un environnement subcellulaire plus approprié que le cytosol pour une action plus spécifique et efficace de ces systèmes enzymatique. Il ne serait pas surprenant si un contrôle similaire de la signalisation du NO était présent dans d'autres types cellulaires sous des conditions physiologiques ou pathophysiologiques. En fait, la présence de la eNOS nucléaire et le rôle du NO au niveau du noyau, ont été démontré dans la littérature, mais pas de façon concluante.

L'hypothèse de cette étude est que la eNOS est présente et active au niveau nucléaire et que le NO produit par cette enzyme régule la transcription de gènes. Les résultats présentés dans ce mémoire illustrent pour la première fois, des preuves expérimentales convaincantes de la présence et de la translocation de eNOS au niveau du noyau en utilisant différentes techniques telles que l'immunofluorescence chez les cellules COS-1 exprimant la protéine de fusion eNOS-GFP ainsi que chez les cellules endothéliales, la microscopie électronique et l'immunobuvardage dans des fractionnements de tissus de foie de rat. Nous démontrons également que la eNOS

nucléaire peut être active par la mesure de production de nitrite et par l'étude de sa phosphorylation sur le résidu Ser1177 suite à l'activation de noyaux isolés de foie de rat avec le sLPA. De plus, nos résultats révèlent pour la première fois la présence basale de la guanylate cyclase soluble (GCs) dans les noyaux de foie de rat ainsi que son activité (production de GMPc après stimulation avec le donneur de NO, le sodium nitroprussiate (SNP)). Finalement, nous démontrons que la stimulation de noyaux isolés de foie de rat avec le SNP induit l'expression du gène iNOS et que cette transcription découle de l'activité subséquente de la GCs, de la PKG, du Ca^{2+} , des MAPKs et du NF- κ B. Ces résultats établissent pour la première fois un mécanisme important par lequel le NO dérivé possiblement de la eNOS peut agir comme molécule de signalisation dans le noyau et induire ainsi la transcription du gène iNOS (Figure 4).

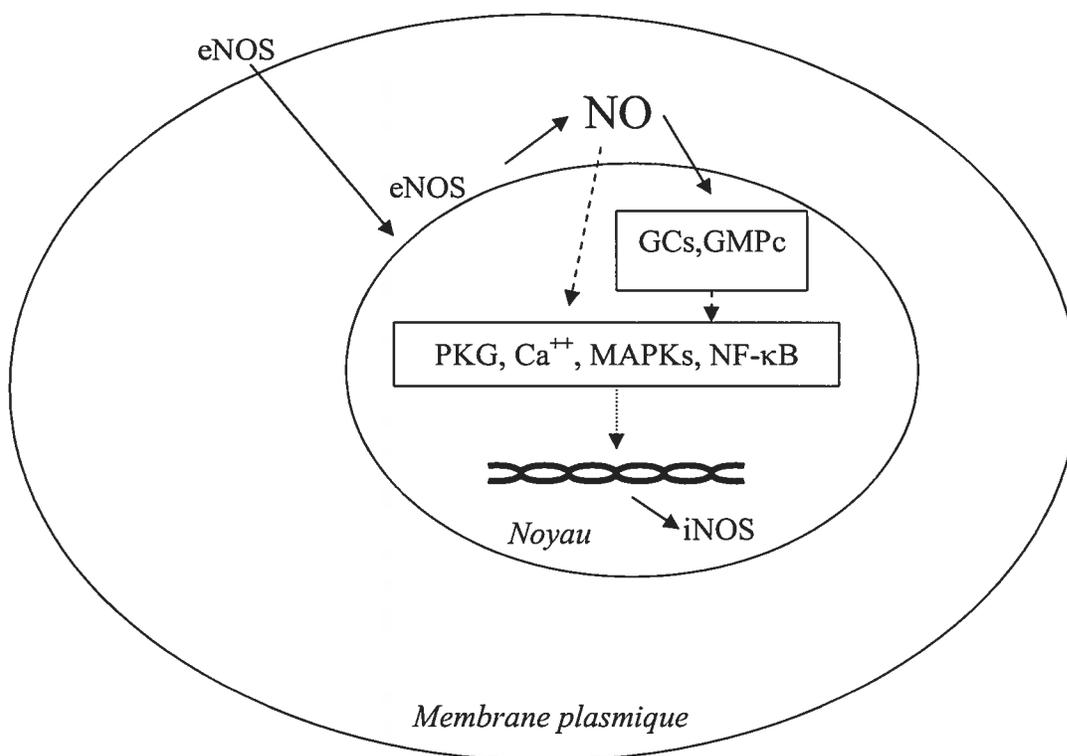


Figure 4- Résumé des résultats obtenus

Le premier objectif de cette étude fut de démontrer la présence nucléaire de la eNOS. Premièrement, nous avons testé l'hypothèse que l'enzyme eNOS pouvait transloquer au noyau suite à une stimulation avec l'acide lysophosphatidique (LPA) puisque ce dernier est connu pour activer la eNOS (Kou R. *et al.*, 2002) et que les récepteurs au LPA (LPA1) ont été identifiés aux noyaux d'hépatocytes foie de rat et sont fonctionnels (Gobeil F. *et al.*, 2003). Nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence avec des cellules COS-1 transfectées avec l'enzyme eNOS fusionnée avec la protéine fluorescente verte (GFP) (Fig. 3.1-I). Nous avons également utilisé des PCECs. Les cellules ont été traitées avec le sLPA (10 μ M). Nos images en microscopie confocale démontrent clairement une translocation de l'enzyme eNOS dans les deux systèmes cellulaires (PCEC et COS-1) après 15 min, translocation soutenue même après 30 min. Par ailleurs, des études *in situ* en microscopie électronique dans des tissus de foie de rat ont montré une présence basale de la eNOS dans les noyaux d'hépatocytes (Fig. 3.1-II). Des expériences d'immunobuvardage de fractionnements de foie de rat ont confirmé les observations puisque les bandes de protéines immunoréactives obtenues au niveau des fractions nucléaires ont la même masse moléculaire que les protéines de la membrane plasmique impliquant que la eNOS nucléaire semble identique à celle de la membrane plasmique (Fig 3.2-A).

Le mécanisme par lequel la translocation influence l'activation de eNOS n'est pas complètement élucidé. La localisation de la eNOS change selon l'activation de la membrane au cytosol et la translocation semble être importante pour l'activation ou l'inactivation de l'enzyme. Un des mécanismes important qui peut entrer en jeu est la palmitoylation de la eNOS. La S-palmitoylation peut survenir de façon spontanée sous certaines conditions et peut également être catalysée par des protéines palmitoyltransférases localisées dans le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi et les membranes plasmiques (Linder M.E. *et al.*, 2003). Des protéines

eNOS mutantes déficientes en palmitoylation sont attachées aux membranes et ne sont pas transportées à la membrane plasmique; elles s'accumulent plutôt dans l'appareil de Golgi (Robinson L.J. *et al.*, 1995b; Sowa G. *et al.*, 1999) suggérant que la palmitoylation est essentielle au ciblage de la eNOS à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique mais pas entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Par contre, on ne sait pas encore si la palmitoylation de eNOS survient dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi et si la palmitoylation est le seul signal ou si d'autres interactions protéines-protéines dans l'appareil de Golgi sont nécessaires pour cibler eNOS à la membrane plasmique.

Alors que la palmitoylation de eNOS joue un rôle important dans son ciblage à la membrane plasmique, il a été suggéré que la dépalmitoylation pourrait jouer un rôle dans la translocation de eNOS de la membrane plasmique au cytoplasme après son activation par certains agonistes extracellulaires. Les agonistes tels que la bradykinine (Prabhakar P. *et al.*, 1998), l'œstrogène (Goetz R.M., *et al.*, 1999), le céramide (Igarashi J. *et al.*, 1999) et le VEGF (Feng Y. *et al.*, 1999) induisent la translocation de la eNOS de la membrane plasmique au cytoplasme en diminuant son association avec la cavéoline-1. La dépalmitoylation pourrait donc représenter un mécanisme possible pour la relâche de protéines de signalisation de la membrane en réponse à une stimulation avec un agoniste (Robinson L.J. *et al.*, 1995a). Une enzyme spécifique capable de catalyser la dépalmitoylation de la eNOS *in vitro* a été identifiée, l'acyl-protéine-thioestérase 1 (Yeh D.C. *et al.*, 1999). Finalement, on sait que l'activation de eNOS et la production de NO production peuvent influencer la dépalmitoylation (Hess D.T. *et al.*, 1993).

Par ailleurs, un autre mécanisme important dont il faudrait tenir compte est la liaison de la eNOS avec la HSP90. En fait, quelques agonistes de eNOS, tels que l'œstrogène, le VEGF et la force de cisaillement semblent induire la liaison de la HSP90 avec la eNOS (Garcia-Cardena G. *et al.*, 1998; Kone B.C., 2000; Chambliss K.L. *et al.*, 2002). La HSP90 est une chaperone moléculaire

qui joue un rôle essentiel dans la maturation de plusieurs protéines. Ensemble avec d'autres membres de la famille des HSP (HSP70, HSP34), ces protéines aident à stabiliser les structures de chaînes de polypeptides naissants, augmentant leur stabilité et en prévenant leur dégradation. HSP90 co-immunoprécipite avec eNOS dans des extraits de cellules endothéliales (Gratton J.P. *et al.*, 2000) et l'association de eNOS avec HSP90 augmente la production de NO. Par contre, on ne sait pas encore si l'interaction entre HSP90 et un complexe de protéines dont eNOS fait partie constituerait la machinerie nécessaire qui régule le routage intracellulaire de la eNOS.

Finalement, des protéines tels que la dynamine-2, la NOSIP (protéine interagissant avec eNOS) et la NOSTRIN (NOS 3 trafic inducer) sont également des candidats importants pour la relocalisation de la eNOS. Des données montrent que la dynamine-2 (Cao S. *et al.* 2001) ou la NOSIP (Dedio J. *et al.*, 2001) peuvent promouvoir la relocalisation de la eNOS de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi à des structures ressemblant à des vésicules distribuées dans le cytosol. La NOSTRIN semble réguler le ciblage intracellulaire de la eNOS dans différents types cellulaires (Zimmermann K. *et al.*, 2002). Par contre, le rôle physiologique, s'il y en a, joué par ces protéines dans la régulation de eNOS reste à être déterminé.

Le concept courant assume que le NO diffuse librement à travers la membrane plasmique dans le cytoplasme de la cellule cible, où il active son enzyme récepteur cytosolique, la GCs. Néanmoins, le NO est de 6-20 fois plus soluble dans des couches lipidiques comparé avec les fractions aqueuses (Malinski T. *et al.*, 1993). Puisque la quantité du NO a été montrée être en plus grande concentration aux ou près des membranes et en plus petite concentration dans un environnement aqueux (Malinski T. *et al.*, 1993), il serait logique de penser que le site d'action du NO n'est pas le cytosol mais plutôt les membranes cellulaires. La GCs présente à la membrane nucléaire serait plus proche de l'enzyme eNOS et du produit NO suggérant un mode d'activation

plus efficace que lorsqu'elle est localisée dans le cytoplasme. Récemment, des chercheurs ont découvert que la GCs est partiellement associée avec la membrane plasmique et qu'elle comporte une sensibilité accrue pour le NO, Après l'activation cellulaire, la GCs transloque à la fraction membranaire dans les plaquettes humains et s'associe avec la fraction des caveolae et ce d'une manière dépendante de la concentration du calcium intracellulaire (Zabel U. *et al.*, 2002). Par ailleurs, des données récentes ont montré que l'activation des éléments du promoteur fos par le NO requièrent une translocation nucléaire de la PKG (Gudi T. *et al.*, 2000).

Notre prochain objectif fut donc d'étudier la présence de la GCs au niveau du noyau. La GCs a été retrouvée au niveau nucléaire et périnucléaire d'hépatocytes de rat. Des études en immunobuvardage (Fig. 3.2-A) nous ont révélé une bande immunoréactive pour la sous-unité β -1 de la guanylate soluble dans des fractions nucléaires d'hépatocytes de foie de rat. Ces bandes ont le même poids moléculaire apparent que celui retrouvée dans le cytosol. Nos expériences en cryomicroscopie ont venu confirmer cette observation (Fig. 3.2-B).

Les enzymes eNOS et GCs sont donc présentes au niveau nucléaire. La Hsp90 pourrait jouer un rôle essentiel dans ce mécanisme, car il a été montré pouvant interagir avec la eNOS et la GCs (Venema R.C., et al. 2003). Par conséquent, la Hsp90 pourrait être impliqué dans le transport nucléaire de la eNOS et la GCs.

Par la suite, nous avons voulu vérifier l'activité de la eNOS ainsi que de la GCs nucléaire. Afin de tester l'hypothèse que la eNOS nucléaire pouvait produire du NO, nous avons utilisé des noyaux isolés de foie de rat (puisque ces derniers peuvent être obtenus en très grande quantité et de façon très pure) que nous avons stimulé avec le sLPA. Le nitrite a été mesuré par chemiluminescence avec l'appareil NO analyser [Sievers]. Nos résultats révèlent que la eNOS

nucléaire présente de façon basale peut être activée de façon dose dépendante avec le sLPA (1 μ M et 10 μ M) et que cette activation peut être bloquée par l'inhibiteur des NOS, le L-NAME ainsi que par l'antagoniste du récepteur LPA₁, le THG-1603 (Fig. 3.3A). L'activité de la eNOS nucléaire a été également testée par la phosphorylation de son résidu Ser1177 induite par le sLPA. Des noyaux isolés de foie de rat ont été stimulés avec le sLPA, et on a pu remarquer une augmentation du degré de la phosphorylation de la eNOS après 5 min; cette phosphorylation fut soutenue après 15 min (Fig. 3.3B). Ces deux techniques combinées nous a permis de conclure que l'activation de la eNOS nucléaire par le sLPA est spécifique.

Dans le but d'étudier l'activité nucléaire de la GCs, des noyaux de foie de rat ont également été utilisés et stimulés avec un donneur rapide de NO, le sodium nitroprussiate (SNP) (Fig. 3.4). La production de GMPc a été mesurée après 20 min à l'aide d'un kit radioimmunoessai commercial. Nous avons constaté une production dose-dépendante de GMPc qui peut être bloquée par l'ODQ, un inhibiteur de la GCs (Fig. 3.4).

Le noyau est une barrière dynamique aux ions incluant le calcium (Mazzanti M. *et al.*, 2001); dans l'état non-stimulé, les préparations nucléaires exhibent des concentrations stables de Ca²⁺ (Gobeil F.*et al.*, 2002). Le calcium nucléaire joue un rôle dans la réparation de l'ADN, la condensation de la chromatine et dans la régulation de la transcription génique (D'Santos CS, 1998; Gobeil F 2002). Les canaux calciques IP₃, IP₄, les canaux K_{Ca} et les récepteurs ryanodine, de même que des pompes telle la pompe Ca²⁺-ATPase, sont impliqués dans ces mécanismes de régulation du Ca²⁺ (Malviya A.N. *et al.*, 1990; Gerasimenko O.V. *et al.*, 1996; Gobeil F. *et al.*, 2002).

Puisque l'objectif de cette étude était d'étudier le rôle du NO dans la transcription génique, nous avons voulu tester si le SNP pouvait moduler le calcium nucléaire avec des sondes sensibles au Ca^{2+} tels que le fluo-4-AM et le fura-2-AM. Des expériences en microscopie confocale illustrent clairement des mouvements calciques à l'intérieur de noyaux isolés de foie de rat en réponse à une stimulation avec le SNP (Fig. 4A-B). À l'aide d'expériences de spectrophotométrie en utilisant la sonde fura-2-AM, nous avons pu déterminer que cette mobilisation calcique était dépendante du Ca^{2+} extra- et intranucléaire, de la GCs, ainsi que de la PKG (Fig. 4C).

Les mécanismes par lesquels les canaux calciques pourraient être activés comprennent la S-nitrosylation. La S-nitrosylation des résidus cystéyls résultant en l'addition d'un groupe NO^+ modifie l'activité de différentes protéines. Le NO interagit avec l' O_2 ou le $\text{O}_2^{\cdot -}$ pour produire des espèces réactives d'azote (RNS) capables de nitrosiler des résidus cystéyls. Des données ont démontré que la nitrosylation modifie la fonction de certaines protéines incluant le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Choi Y.B. *et al.*, 2000), la p21^{Ras} (Lander H.M. *et al.*, 1997), la caspase-3 (Mannick J.B. *et al.*, 1999), et la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Molina y Vedia L. *et al.*, 1992), suggérant que la S-nitrosylation puisse être un mécanisme important dans la régulation cellulaire. De plus, la nitrosylation semble moduler l'activité de certains canaux, tel que le récepteur ryanodine qui est activé par cette modification post-traductionnelle (Xu L. *et al.*, 1998). On ne peut donc exclure totalement un mécanisme par lequel les canaux calciques nucléaires pourraient être activés par le NO suite à une nitrosylation.

Par la suite, nous avons voulu étudier si le NO pouvait activer les MAP kinases nucléaires. En effet, les MEK-1 ont été localisés dans le noyau (Kim S.J. *et al.*, 1997). Des noyaux isolés de foie de rat ont été stimulés avec le SNP (1 μM) et la MAPK p42 a été

phosphorylée d'une manière dépendante du temps (Fig. 3.6 A). De plus, Cette phosphorylation des ERK1/2 par le SNP semble être dépendante de la voie GCs-PKG, ainsi que du calcium (Fig. 3.6 B). Des données récentes indiquent que la NO peut activer les MAPK p38 et p42/p44 (ERK1/2) d'une manière dépendante du GMPc et de la PKG dans plusieurs types cellulaires. Par exemple, l'expression de la métalloprotéinase-13 et de la hème-oxygénase-1 dans les cellules endothéliales est dépendante de l'activation de ERK1/2 (Zaragoza C. *et al.*, 2002; Kiemer A.K. *et al.*, 2003).

Par ailleurs, nous avons voulu tester à l'aide de la technique de RT-PCR les effets d'un donneur de NO sur la transcription du gène iNOS dans les noyaux isolés de foie de rat. La technique de RT-PCR a été précédemment utilisée pour détecter la transcription de gènes suite à une stimulation de noyaux isolés (Battacharya M. *et al.*, 1999; Gobeil F. *et al.*, 2002; Marrache A.M. *et al.*, 2002). Une stimulation avec le SNP induit de façon dose-dépendante la transcription du gène iNOS (Fig. 3.7 A). La voie de signalisation nucléaire par le donneur de NO qui est impliquée dans la transcription du gène iNOS a également été étudiée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. Nous avons découvert que l'induction du gène iNOS par le NO découle de l'activité subséquente de la GCs, de la PKG, du calcium, des MEK/ERK1/2 et du NF-kB (Fig. 3.7 B).

Plusieurs études ont déjà démontré un rôle du NO dans la transcription génique. Les actions du NO sur la transcription de gènes semblent impliqués la S-nitrosylation de protéines avec une altération subséquente de facteurs de transcription liant le site du promoteur (Lee BS *et al.*, 2001; Marshall H.E. *et al.*, 2001), de même que l'activation de la GCs qui stimulent la voie de signalisation de la protéine kinase G dépendante du GMPc (PKG) (Morris B.J., 1995). Des données ont montré que la voie de signalisation NO/GMPc peut moduler la transcription de

plusieurs gènes dans différents types cellulaires. Parmi les produits de gènes pouvant être modulés par le NO/GMPc, on retrouve le TNF- α , la cyclooxygénase-2 (COX-2), la iNOS, *c-fos*, *c-jun*, la GCs, et la PKG (Kalra D. *et al.*, 2000; Perez-Sala D.(A) et (B) *et al.*, 2001; Pilz R.B. *et al.*, 1995; Soff G.A. *et al.*, 1997).

En dernier lieu, les MAPK, une fois phosphorylée peuvent alors activer le NF-kB (Garcia-Garcia E. *et al.*, 2001). Habituellement, le NF-kB forme un complexe avec sa sous-unité inhibitrice, dans le cytoplasme. Il y a dissociation de ce complexe suite à la phosphorylation de I κ B induite par un stimulus extérieur (Karin M. *et al.*, 2000). Comme le NF-kB, le I κ B libre (non dégradé) peut alors entrer à l'intérieur du noyau (Sachdev S. *et al.*, 1998; Karin M. *et al.*, 2000) et se ré-associer avec le NF-kB. L'I κ B et le NF-kB contiennent tous deux des séquences de localisation nucléaires (NLS) ce qui permet d'expliquer comment ces sous-unités peuvent voyager entre le noyau et le cytoplasme, et la présence du complexe NF-kB dans le noyau (Carlotti F. *et al.*, 2000). Le NF-kB pourrait être également activé par le GMPc à l'aide d'une phosphorylation directe par le PKG des sous-unités p50 et p65 (He B. *et al.*, 2003). La région du promoteur du gène iNOS contient des séquences de liaison pour le NF-kB. Nous avons finalement trouvé que le SNP pouvait induire une liaison du NF-KB avec sa séquence consensus d'ADN dans des extraits nucléaires par la technique des gels à retardement (EMSA) (Fig. 3.7 C).

Il faudrait mentionner également que le SNP a été utilisé comme donneur de NO tout au long de ce projet. Puisque le SNP est connu pour relâcher du cyanure (CN⁻) (un maximum de cinq équivalents de CN⁻ par mole de SNP), cela pourrait affecter les réponses cellulaires. Des contrôles avec cet anion devrait être utilisé dans le futur.

En résumé, les données présentées dans ce mémoire démontre que la eNOS est non seulement distribuée dans les membranes cellulaires, mais également dans le noyau. La eNOS nucléaire offre de nouvelles avenues pour des actions intracellulaires du NO. Des études plus poussées sont nécessaires afin de clarifier en détails les mécanismes de transduction du signal impliqués dans les actions du NO via la GCs nucléaire et de déterminer si les résultats obtenus dans des noyaux isolés sont transférables dans des cellules avec noyaux intacts et d'origine vasculaire.

CHAPITRE 5

CONCLUSION ET DIRECTIONS FUTURES

Ce mémoire comporte des données suggérant la présence de l'enzyme eNOS au niveau nucléaire chez plusieurs types cellulaires dont, les cellules COS-1 transfectées avec eNOS-GFP, les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux porcins (PCEC) ainsi que dans des hépatocytes de foie de rat. Plusieurs techniques expérimentales ont été utilisées pour démontrer la translocation nucléaire de la eNOS et sa fonctionnalité. Une nouvelle voie de signalisation du NO liée à l'expression de gènes a été révélée. Le NO nucléaire semble signaler via une guanylate cyclase soluble fonctionnelle également découverte au noyau. Cette nouvelle voie de signalisation intracrine du NO nécessite la participation également de la PKG, du calcium, des MAPK ainsi que du NF- κ B.

Ces découvertes ouvrent de nouvelles avenues dans le domaine de la recherche porté sur la biologie du NO. Plusieurs études restent à être élaborer afin de répondre à plusieurs questions telles que les mécanismes impliqués dans la translocation de la eNOS ainsi que la voie de signalisation détaillée du NO et de la GCs nucléaires. De plus, une étude approfondie du rôle de la eNOS nucléaire *in vivo* serait nécessaire.

CHAPITRE 6

RÉFÉRENCES

Abderrahmane A, Salvail D, Dumoulin M, Garon J, Cadieux A, Rousseau E. Direct activation of K(Ca) channel in airway smooth muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19(3):485-97.

Abe K, Pan LH, Watanabe M, Kato T, Itoyama Y. Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1995; 199(2):152-4.

Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(22):10769-72.

Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J Biol Chem.* 1994; 269(51):32047-50.

An S, Bleu T, Zheng Y, Goetzl EJ. Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization. *Mol Pharmacol.* 1998; 54(5):881-8.

Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(23):10909-13.

Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1993; 108(3):833-7.

Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996; 78(5):750-8.

Bachmaier K, Neu N, Pummerer C, Duncan GS, Mak TW, Matsuyama T, Penninger JM. iNOS expression and nitrotyrosine formation in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon regulatory transcription factor 1. *Circulation.* 1997; 96(2):585-91.

Baker RR, Chang HY. Alkylglycerophosphate acetyltransferase and lyso platelet activating factor acetyltransferase, two key enzymes in the synthesis of platelet activating factor, are found in neuronal nuclei isolated from cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1302(3):257-63.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 218(1):40-4.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271:C1424-37.

Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 1999; 274(3):1472-8.

Bentz BG, Barnes MN, Haines GK, Lurain JR, Hanson DG, Radosevich JA. Cytoplasmic localization of endothelial constitutive nitric oxide synthase in endometrial carcinomas. *Tumour Biol.* 1997;18(5):290-300.

Bernier SG, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2000; 275(39):30707-15.

Bhattacharya M, Peri KG, Almazan G, Ribeiro-da-Silva A, Shichi H, Durocher Y, Abramovitz M, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(26):15792-7.

Bhattacharya M, Peri K, Ribeiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR, Chemtob S. Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem.* 1999; 274(22):15719-24.

Bian K, Davis K, Kuret J, Binder L, Murad F. Nitrotyrosine formation with endotoxin-induced kidney injury detected by immunohistochemistry. *Am J Physiol.* 1999; 277:33-40.

Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F. Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ;96(13):7553-7.

Bkaily G, Jaalouk D, Jacques D, Economos D, Hassan G, Simaan M, Regoli D, Pothier P. Bradykinin activates R-, T-, and L-type Ca²⁺ channels and induces a sustained increase of nuclear Ca²⁺ in aortic vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997; 75(6):652-60.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle *Nature.* 1994; 368(6474):850-3.

Booz GW, Conrad KM, Hess AL, Singer HA, Baker KM. Angiotensin-II-binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology.* 1992; 130(6):3641-9.

Bosse HM, Bachmann S. Immunohistochemically detected protein nitration indicates sites of renal nitric oxide release in Goldblatt hypertension. *Hypertension*. 1997; 30(4):948-52.

Braugher JM, Mittal CK, Murad F. Effects of thiols, sugars, and proteins on nitric oxide activation of guanylate cyclase. *J Biol Chem*. 1979; 254(24):12450-4.

Braugher JM. Oxidative modulation of soluble guanylate cyclase by manganese. *Biochim Biophys Acta*. 1980; 616(1):94-104.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(2):682-5.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 1991; 351(6329):714-8.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63:175-95.

Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1995; 82(5):743-52.

Brenman JE, Bredt DS. Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods Enzymol*. 1996;269:119-29.

Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Bredt DS. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev Neurosci*. 1997;19(3):224-31.

Broillet MC, Firestein S. Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron*. 1996; 16(2):377-85.

Broillet MC. A single intracellular cysteine residue is responsible for the activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by NO. *Biol Chem.* 2000; 275(20):15135-41.

Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(35):32663-9.

Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem.* 1993; 268(12):8410-3.

Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 185(3):960-6.

Buchwalow IB, Schulze W, Kostic MM, Wallukat G, Morwinski R. Intracellular localization of inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes in culture. *Acta Histochem.* 1997; 99(2):231-40.

Busse R, Luckhoff A, Bassenge E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987; 336(5):566-71.

Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Frohlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HH. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2000; 275(7):5179-87.

Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 1996; 75(1):77-85.

Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 1995 Mar;20(3):117-22.

Cao S, Yao J, McCabe TJ, Yao Q, Katusic ZS, Sessa WC, Shah V. Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function. *J Biol Chem.* 2001; 276(17):14249-56.

Carlotti F, Dower SK, Qwarnstrom EE. Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem.* 2000; 275(52):41028-34.

Castel MN, Woulfe J, Wang X, Laduron PM, Beaudet A. Light and electron microscopic localization of retrogradely transported neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience.* 1992; 50(2):269-82.

Chabrier PE, Demerle-Pallardy C, Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(8-9):1029-35.

Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 2002; 23(5):665-86.

Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1994; 269(9):6765-72.

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1992; 12(3):915-27.

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999; 103(3):401-6.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999; 443(3):285-9.

Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 2000; 3(1):15-21.

Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002; 54(2):265-9.

Cocco L, Martelli AM, Gilmour RS, Rhee SG, Manzoli FA. Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1530(1):1-14.

Corbett JA, McDaniel ML. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes.* 1992; 41(8):897-903.

Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996; 79(5):984-91.

de Weerd WF, Leeb-Lundberg LM. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled G α subunits G α q and G α h in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1997; 272(28):17858-66.

Daff S, Sagami I, Shimizu T. The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca²⁺/calmodulin-dependent electron transfer. *J Biol Chem.* 1999; 274(43):30589-95.

Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(11):470-3.

Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:203-36.

Dedio J, Konig P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Muller-Esterl W. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J.* 2001; 15(1):79-89.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994 ;76(6):1025-37.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399(6736):601-5.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(10):4214-8.

Djordjevic S, Roberts DL, Wang M, Shea T, Camitta MG, Masters BS, Kim JJ. Crystallization and preliminary x-ray studies of NADPH-cytochrome P450 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(8):3214-8.

D'Santos CS, Clarke JH, Divecha N. Phospholipid signaling in the nucleus. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1436:201-232.

Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19199-208.

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998;19(4-5):221-357.

Fan JS, Zhang Q, Li M, Tochio H, Yamazaki T, Shimizu M, Zhang M. Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme. *J Biol Chem.* 1998; 273(50):33472-81.

Faure MP, Nouel D, Beaudet A. Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience.* 1995; 68(2):519-29.

Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Caldwell RB. VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256(1):192-7.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(37):22810-4.

Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1997; 272(28):17744-8.

Fleming I, Bauersachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(3):1123-8.

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001; 88(11):E68-75.

Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res.* 2002; 90(8):866-73.

Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett.* 1993; 326(1-3):1-3.

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 1994;78(6):1039-49.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999; 399(6736):597-601.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288(5789):373-6.

Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, Knowles RG, Salter M, Kiff RJ, Duffy C, Hazelwood R, Oplinger JA, Garvey EP. Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem.* 1994; 269(43):26677-83.

Gachhui R, Presta A, Bentley DF, Abu-Soud HM, McArthur R, Brudvig G, Ghosh DK, Stuehr DJ. Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Calmodulin response is complete within the reductase domain itself. *J Biol Chem.* 1996; 271(34):20594-602.

Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, Presta A, Blazing MA, Mayer B, George SE, Stuehr DJ. Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem.* 1998; 273(10):5451-4.

Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, et al. Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem.* 1999; 274(42):30101-8.

Garcia-Bustos J, Heitman J, Hall MN. Nuclear protein localization. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1071(1):83-101.

Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(13):6448-53.

Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem.* 1996; 271(44):27237-40.

Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272(41):25437-40.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998; 392(6678):821-4.

Garcia-Garcia E, Sanchez-Mejorada G, Rosales C. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF-kappaB activation but not for phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 70(4):649-58.

Garvey EP, Tuttle JV, Covington K, Merrill BM, Wood ER, Baylis SA, Charles IG. Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 311(2):235-41.

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJ, Knowles RG. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272(8):4959-63.

Gath I, Closs EI, Godtel-Armbrust U, Schmitt S, Nakane M, Wessler I, Forstermann U. Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB J.* 1996; 10(14):1614-20.

Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Arch.* 1996; 432: 1-6.

Gerzer R, Bohme E, Hofmann F, Schultz G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 1981; 132(1):71-4.

Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26(4):190-5.

Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ. Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem.* 1998; 273(35):22267-71.

Gilchrist M, McCauley SD, Befus AD. Expression, localization and regulation of nitric oxide synthase (NOS) in human mast cell lines: Effects on leukotriene production. *Blood*. 2004; 104(2):462-9.

Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987; 56:615-49.

Giordano A, Tonello C, Bulbarelli A, Cozzi V, Cinti S, Carruba MO, Nisoli E. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett*. 2002; 514(2-3):135-40.

Gobeil F Jr, Dumont I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, Abran D, Hou X, Beauchamp MH, Quiniou C, Bouayad A, Choufani S, Bhattacharya M, Molotchnikoff S, Ribeiro-Da-Silva A, Varma DR, Bkaily G, Chemtob S. Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors. *Circ Res*. 2002; 90(6):682-9.

Gobeil F Jr, Bernier SG, Vazquez-Tello A, Brault S, Beauchamp MH, Quiniou C, Marrache AM, Checchin D, Sennlaub F, Hou X, Nader M, Bkaily G, Ribeiro-da-Silva A, Goetzl EJ, Chemtob S. Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem*. 2003; 278(40):38875-83.

Gobeil F Jr, Vazquez-Tello A, Marrache AM, Bhattacharya M, Checchin D, Bkaily G, Lachapelle P, Ribeiro-Da-Silva A, Chemtob S. Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81(2):196-204.

Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(6):2788-93.

Gosink EC, Forsberg EJ. Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca²⁺ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am J Physiol.* 1993; 265:1620-9.

Govers R, van der Sluijs P, van Donselaar E, Slot JW, Rabelink TJ. Endothelial nitric oxide synthase and its negative regulator caveolin-1 localize to distinct perinuclear organelles. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(6):779-88.

Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 1996; 385(1-2):63-6.

Grady EF, Garland AM, Gamp PD, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Mol Biol Cell.* 1995; 6(5):509-24.

Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem.* 2000; 275(29):22268-72.

Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994; 269(34):21644-9.

Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *J Biol Chem.* 1996; 271(9):4597-600.

Gudi T, Lohmann SM, Pilz RB. Regulation of gene expression by cyclic GMP-dependent protein kinase requires nuclear translocation of the kinase: identification of a nuclear localization signal. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(9):5244-54.

Gudi T, Casteel DE, Vinson C, Boss GR, Pilz RB. NO activation of *fos* promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene*. 2000; 19(54):6324-33.

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(17):7809-13.

Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest*. 1994; 94(6):2407-13.

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994;265(5173):808-11.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*. 2001; 7(4):801-19.

Handy RL, Harb HL, Wallace P, Gaffen Z, Whitehead KJ, Moore PK. Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol*. 1996; 119(2):423-31.

Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*. 1997; 385(6613):260-5.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, Venema RC. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(3):165-70.

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, et al. 2000. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*. 2000; 87:677-82.

Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36(4):341-6.

He B, Weber GF. Phosphorylation of NF-kappaB proteins by cyclic GMP-dependent kinase. A noncanonical pathway to NF-kappaB activation. *Eur J Biochem.* 2003; 270(10):2174-85.

Hecker M, Mulsch A, Bassenge E, Forstermann U, Busse R. Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications. *Biochem J.* 1994; 299:247-52.

Hemmens B, Woschitz S, Pitters E, Klosch B, Volker C, Schmidt K, Mayer B. The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 1998; 430(3):397-400.

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987; 235(4787):473-6.

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(5):3459-67.

Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Dec;18(12):484-91.

Hornick CA, Anthony CT, Hughey S, Gebhardt BM, Espenan GD, Woltering EA. Progressive nuclear translocation of somatostatin analogs. *J Nucl Med.* 2000;41(7):1256-63.

Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell.* 1993;75(7):1273-86.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 377(6546):239-42.

Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun*. 1993;18(4):195-9.

Humbert JP, Matter N, Artault JC, Koppler P, Malviya AN. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem*. 1996; 271(1):478-85.

Igarashi J, Thatte HS, Prabhakar P, Golan DE, Michel T. 1999 Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(22):12583-8.

Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79(9):2870-3.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(24):9265-9.

Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990; 30:535-60.

Ignarro LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels*. 1991; 28(1-3):67-73.

Ignarro LJ, Wood KS, Wolin MS. Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 1984; 17:267-74.

Ishikawa T, Hume JR, Keef KD. Regulation of Ca²⁺ channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1993; 73(6):1128-37.

Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, Ozasa S, Yamakawa K, Matsuzaki M, Mohammed MU, Nakazawa H, Kasajima T, Marumo F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation.* 1997; 95(2):489-96.

Jaffrey SR, Snyder SH. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science.* 1996; 274(5288):774-7.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):18522-5.

Ju H, Venema VJ, Marrero MB, Venema RC. Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 1998; 273(37):24025-9.

Kalra D, Baumgarten G, Dibbs Z, Seta Y, Sivasubramanian N, Mann DL. Nitric oxide provokes tumor necrosis factor- α expression in adult feline myocardium through a cGMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000; 102(11):1302-7.

Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E, Behbod F, Lee YC, Murad F. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(20):11584-9.

Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1977; 3(1):23-35.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:621-63.

Kiemer AK, Bildner N, Weber NC, Vollmar AM. Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells. *Endocrinology.* 2003; 144(3):802-12.

Kim F, Gallis B, Corson MA. TNF- α inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 280(5):1057-65.

Kim SJ, Kahn CR. Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression. *Biochem J.* 1997; 323:621-7.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(13):5159-62.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994; 298:249-58.

Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993; 9(4):371-7.

Koh SD, Campbell JD, Carl A, Sanders KM. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol.* 1995; 489:735-43.

Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1994; 269(12):8701-7.

Kone BC. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168(1):27-31.

Kou R, Igarashi J, Michel T. Lysophosphatidic acid and receptor-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. *Biochemistry.* 2002; 41(15):4982-8.

Krippeit-Drews P, Kroncke KD, Welker S, Zempel G, Roenfeldt M, Ammon HP, Lang F, Drews G. The effects of nitric oxide on the membrane potential and ionic currents of mouse pancreatic B cells. *Endocrinology.* 1995; 136(12):5363-9.

Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem.* 1989; 264(34):20496-501.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 1994 ;369 (6476):156-60.

Lajoix AD, Reggio H, Charde T, Peraldi-Roux S, Tribillac F, Roye M, Dietz S, Broca C, Manteghetti M, Ribes G, Wollheim CB, Gross R. A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion. *Diabetes.* 2001; 50(6):1311-23.

Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem.* 1997; 272(7):4323-6.

Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1997; 273:119-26.

Lee BS, Kim YM, Kang HS, Kim HM, Pyun KH, Choi I. Octamer binding protein-1 is involved in inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by exogenous nitric oxide in murine liver cells. *J Biochem (Tokyo)*. 2001; 129(1):77-86.

Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HS, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron*. 1992; 8(6):1087-99.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(10):725-34.

Lind GJ, Cavanagh HD. Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993; 34(10):2943-52.

Lind GJ, Cavanagh HD. Identification and subcellular distribution of muscarinic acetylcholine receptor-related proteins in rabbit corneal and Chinese hamster ovary cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995; 36(8):1492-507.

Linder ME, Deschenes RJ. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry*. 2003; 42(15):4311-20.

Lipp P, Thomas D, Berridge MJ, Bootman MD. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J*. 1997; 16(23):7166-73.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364(6438):626-32.

Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry*. 1995; 34(38):12333-40.

Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*. 1996; 35(41):13277-81.

Liu J, Hughes TE, Sessa WC. The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *J Cell Biol*. 1997; 137(7):1525-35.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P and Darnell J (eds). 1995. *Molecular Cell Biology*, 3rd edition. Scientific American Books, Inc. New York, NY. Page 168.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(3):375-414.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(21):11853-8.

Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kaptureczak M, Tomboulion P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 193(3):1076-82.

Malviya AN, Rogue P, Vincendon G. Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87:9270-9274.

Malviya AN, Rogue PJ. "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell*. 1998; 92(1):17-23.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*. 1999; 284(5414):651-4.

Marrache AM, Gobeil F Jr, Bernier SG, Stankova J, Rola-Pleszczynski M, Choufani S, Bkaily G, Bourdeau A, Sirois MG, Vazquez-Tello A, Fan L, Joyal JS, Filep JG, Varma DR, Ribeiro-Da-Silva A, Chemtob S. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol*. 2002; 169(11):6474-81.

Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry*. 2001; 40(6):1688-93.

Martin E, Davis K, Bian K, Lee YC, Murad F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. *Semin Perinatol*. 2000; 24(1):2-6.

Mazzanti M, Bustamante JO, Oberleithner H. Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol Rev*. 2001; 81:1-19.

McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2000; 275(9):6123-8.

McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem*. 1997; 272(50):31213-6.

Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(4):1197-201.

Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem.* 1993; 268(35):26286-95.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol.* 1999; 9:845-48.

Michell BJ, Chen ZZ, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276:17625-28.

Michel T, Li GK, Busconi L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(13):6252-6.

Michel T, Xie Q-W, and Nathan C. 1995. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. *In Methods in Nitric Oxide Research.* M. Feelisch and J.S. Stamler, editors. John Wiley & Sons, UK. 161-175.

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.* 1997; 100(9):2146-52.

Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1997; 272(41):25907-12.

Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32(11):1361-6.

Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276(21):17625-8.

Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1994; 345(1):47-9.

Molina y Vedia L, McDonald B, Reep B, Brune B, Di Silvio M, Billiar TR, Lapetina EG. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J Biol Chem.* 1992; 267(35):24929-32.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38(11):1709-15.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329(27):2002-12.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.* 1997; 49(2):137-42.

Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem.* 1995; 270(22):12949-52.

Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG. L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem.* 1994; 37(23):3886-8.

Morin AM, Stanboli A. Nitric oxide synthase localization in cultured cerebrovascular endothelium during mitosis. *Exp Cell Res.* 1994; 211(2):183-8.

Morris BJ. Stimulation of immediate early gene expression in striatal neurons by nitric oxide. *J Biol Chem.* 1995; 270(42):24740-4.

Murad F, Ishii K, Forstermann U, Gorsky L, Kerwin JF Jr, Pollock J, Heller M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1990; 24:441-8.

Naik RD, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V. Nuclear Ca²⁺ signaling to endothelin-1 in rat aortic smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 31:199-202.

Nakane M, Saheki S, Kuno T, Ishii K, Murad F. Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157(3):1139-47.

Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993; 316(2):175-80.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12):3051-64.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994; 78(6):915-8.

Nedvetsky PI, Sessa WC, Schmidt HH. There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(26):16510-2.

Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci.* 1993;18(4):128-31.

Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem.* 1999; 274(21):14692-8.

Ohno M, Gibbons GH, Dzau VJ, Cooke JP. Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation* 1993; 88:193-97.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333(6174):664-6.

Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 158(1):348-52.

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997; 100:3131-39.

Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; 8(4):542-8.

Peunova N, Enikolopov G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature*. 1993; 364(6436):450-3.

Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 1995; 270(23):14214-9.

Perez-Sala D (A), Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal*. 2001; 3(2):231-48.

Perez-Sala D (B), Cernuda-Morollon E, Diaz-Cazorla M, Rodriguez-Pascual F, Lamas S. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 280(3):466-73.

Petersen OH, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Mogami H, Tepikin AV. The calcium store in the nuclear envelope. *Cell Calcium*. 1998; 23(2-3):87-90.

Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene*. 2001; 20(13):1532-9.

Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, and Boss GR. Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1 responsive promoters in mammalian cells. *FASEB J*. 1995; 9:552-558.

Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(23):10480-4.

Pollock JS, Nakane M, Buttery LD, Martinez A, Springall D, Polak JM, Forstermann U, Murad F. Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol*. 1993; 265:1379-87.

Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 1998; 273(42):27383-8.

Przywara DA, Bhave SV, Bhave A, Wakade TD, Wakade AR. Stimulated rise in neuronal calcium is faster and greater in the nucleus than the cytosol. *FASEB J*. 1991; 5(2):217-22.

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995; 270(13):7420-6.

Ratovitski EA, Alam MR, Quick RA, McMillan A, Bao C, Kozlovsky C, Hand TA, Johnson RC, Mains RE, Eipper BA, Lowenstein CJ. Kalirin inhibition of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 1999; 274(2):993-9.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990; 101(3):746-52.

Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1993 265:299-303.

Robinson LJ, Busconi L, Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995a; 270(3):995-8.

Robinson LJ, Michel T. Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995b; 92(25):11776-80.

Rodriguez-Crespo I, Straub W, Gavilanes F, Ortiz de Montellano PR. Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 359(2):297-304.

Rogers NE, Ignarro LJ. Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 189(1):242-9.

Rogue PJ, Malviya AN. Calcium signals in the cell nucleus. *EMBO J.* 1999; 18(19):5147-52.

Sachdev S, Hoffmann A, Hannink M. Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(5):2524-34.

Salerno JC, Harris DE, Irizarry K, Patel B, Morales AJ, Smith SM, Martasek P, Roman LJ, Masters BS, Jones CL, Weissman BA, Lane P, Liu Q, Gross SS. An autoinhibitory control element defines calcium. *J Biol Chem.* 1997; 272(47):29769-77.

Sanghera JS, Peter M, Nigg EA, Pelech SL. Immunological characterization of avian MAP kinases: evidence for nuclear localization. *Mol Biol Cell*. 1992; 3(7):775-87.

Schievella AR, Regier MK, Smith WL, Lin LL. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1995; 270(51):30749-54.

Schulz S, Yuen PS, Garbers DL. The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol Sci*. 1991; 12(3):116-20.

Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1995; 270(30):17641-4.

Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1995; 270(30):17641-17644.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 1996; 271(11):6518-22.

Shen W, Hintze TH, Wolin MS. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation*. 1995; 92(12):3505-12.

Soff GA, Cornwell TL, Cundiff DL, Gately S, and Lincoln TM. Smooth muscle cell expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed by continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP, and cyclic AMP. *J Clin Invest*. 1997; 100:2580-2587.

Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes TE, Sessa WC. Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem.* 1999; 274(32):22524-31.

Strong MJ, Sopper MM, Crow JP, Strong WL, Beckman JS. Nitration of the low molecular weight neurofilament is equivalent in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and control cervical spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 248(1):157-64.

Sun J, Liao JK. Functional interaction of endothelial nitric oxide synthase with a voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20):13108-13.

Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science.* 1999; 286(5444):1583-7.

Szewczyk A. The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function (review). *Mol Membr Biol.* 1998; 15(2):49-58.

Tang SS, Rogg H, Schumacher R, Dzau VJ. Characterization of nuclear angiotensin-II-binding sites in rat liver and comparison with plasma membrane receptors. *Endocrinology.* 1992; 131(1):374-80.

Taniguchi J, Furukawa KI, Shigekawa M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1993; 423(3-4):167-72.

Tremblay J, Gerzer R, Hamet P. Cyclic GMP in cell function. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1998; 22:319-83.

Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. Hypertension. 1989;13(6):658-67.

Venema VJ, Marrero MB, Venema RC. Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 226(3):703-10.

Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. J Biol Chem 1997; 272(45):28187-90.

Venema RC, Venema VJ, Ju H, Harris MB, Snead C, Jilling T, Dimitropoulou C, Maragoudakis ME, Catravas JD. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 2:669-678.

Viner RI, Huhmer AF, Bigelow DJ, Schoneich C. The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by peroxynitrite. Free Radic Res. 1996; 24(4):243-59.

Waybill MM, Yelamarty RV, Zhang YL, Scaduto RC Jr, LaNoue KF, Hsu CJ, Smith BC, Tillotson DL, Yu FT, Cheung JY. Nuclear calcium gradients in cultured rat hepatocytes. Am J Physiol. 1991; 261(1):49-57.

Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. Lipid modifications of trimeric G proteins. J Biol Chem. 1995; 270(2):503-6.

Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature. 1995;375(6530):408-11.

White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. Biochemistry. 1992; 31(29):6627-31.

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300(1):115-23.

Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(4-5):434-56.

Xia H, Bredt DS. Cloned and expressed nitric oxide synthase proteins. *Methods Enzymol.* 1996; 268:427-36.

Xie X, Wu G, Lu ZH, Ledeen RW. Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *J Neurochem.* 2002; 81(6):1185-95.

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 1998; 279(5348):234-7.

Yeh DC, Duncan JA, Yamashita S, Michel T. Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin. *J Biol Chem.* 1999; 274(46):33148-54.

Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Muller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol.* 2002; 4:307-11.

Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, Lamas S. Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 2002; 62(4):927-35.

Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, Oess S. NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(26):17167-72.

Zou MH, Klein T, Pasquet JP, Ullrich V. Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. *Biochem J.* 1998; 336:507-12.

Zou MH, Leist M, Ullrich V. Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries. *Am J Pathol.* 1999; 154(5):1359-65.

