

Université de Montréal

Rôle du stress oxydatif dans l'augmentation de l'expression des protéines
Giα dans l'hypertension

par
Georgios Lappas

Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention
du grade de *Maîtrise ès sciences* en physiologie

Novembre, 2004

© Georgios Lappas, 2004



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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Rôle du stress oxydatif dans l'augmentation de l'expression des protéines
Giα dans l'hypertension

présenté par :
Georgios Lappas

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|------------------------|-------------------------|
| Rémy Sauvé | Président-rapporteur |
| Madhu Anand-Srivastava | Directrice de recherche |
| Josette Noël | Membre du jury |

*À ma famille et à Ermioni
qui m'ont fourni support et amour*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Madhu Anand-Srivastava pour m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir fourni de précieux conseils tout au long de mes études de maîtrise. J'aimerais aussi remercier mes collègues du laboratoire qui m'ont aidé avec les techniques de laboratoire et qui m'ont permis de me divertir de temps en temps.

J'aimerais remercier le groupe de recherche sur le système nerveux autonome (GRSNA) pour leur support financier. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire du Dr de Champlain pour m'avoir laissé utiliser leurs équipements et de m'avoir aussi fourni de précieux conseils. Finalement, je remercie Claude Gauthier pour son aide avec les graphiques.

Résumé

Les protéines G jouent un rôle important dans une variété de voies de signalisation incluant le système adénylate cyclase/AMPc. Des altérations des niveaux de l'expression des protéines G ont été détectées dans plusieurs modèles animaux d'hypertension incluant les rats spontanément hypertendus (SHR). Notre laboratoire a montré au préalable qu'il y avait une augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ et de leur ARNm dans les cœurs et aortes des SHR comparé aux rats témoins Wistar-Kyoto (WKY) tandis que les niveaux de $G_{s\alpha}$ ne changeaient pas. L'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ précède l'apparition de l'hypertension chez les SHR suggérant que l'augmentation de l'expression de ces protéines est un facteur qui contribue à la pathogenèse de l'hypertension. De plus, lorsque ces rats sont traités avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, il y a une diminution de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ chez les SHR suggérant un rôle de l'angiotensine II (ang II) dans l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ chez les SHR. Il est connu que le stress oxydatif est augmenté chez les SHR et que l'angiotensine II augmente le stress oxydatif. Il se peut donc que le stress oxydatif soit un facteur qui contribue à l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ chez les SHR. De plus, notre laboratoire a montré qu'il y avait une implication de la voie des MAPK dans l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ induite par l'angiotensine II chez les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) A10. Les présentes études ont été entreprises afin d'examiner si le stress oxydatif joue un rôle dans l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ chez les SHR et si la voie des MAPK module l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ par le

stress oxydatif chez les SHR. Des CMLV d'aorte de rats WKY et SHR de 12 semaines ont été utilisées pour ces expériences. On a montré, par immunobuvardage, qu'il y a une augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV des rats WKY. Cette surexpression a été abolie par les antioxydants N-acétyl-L-cystéine (NAC) et diphénylèneiodonium (DPI). Cette augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV de SHR a eu aussi des effets sur l'activité de l'adénylate cyclase, notamment une augmentation de l'inhibition de l'activité de cet enzyme par les hormones Ang II et le C-ANP₄₋₂₃ (un analogue du peptide natriuretique auriculaire), une augmentation par le GTP γ S (un analogue non-hydrolysable du GTP) de l'inhibition de l'activité de l'adénylate stimulée par la forskoline. De plus, il y a eu une diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase par le GTP γ S, l'isoprotérenol et le fluorure de sodium (NaF) dans les CMLV des SHR comparé aux CMLV des rats WKY. Les antioxydants NAC et DPI ont empêché ces altérations de l'adénylate cyclase. De plus, le PD98059, un inhibiteur spécifique des MEK, a rétabli l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV de SHR vers les niveaux WKY suggérant un rôle de la voie des MAPK dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 chez les SHR. En effet, il y a une plus grande phosphorylation de ERK 1/2 dans les CMLV des SHR comparé aux CMLV des rats WKY et ce niveau de phosphorylation de ERK 1/2 a été rétabli vers les niveaux de WKY par NAC et DPI. Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif joue un rôle dans l'augmentation de l'expression de protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 chez les SHR et ses effets sont médiés par la voie des MAPK.

Mots clés : Adénylate cyclase, protéines G, hypertension, MAPK, stress oxydatif.

Summary

G-proteins play an important role in a variety of signalling pathways including the adenylyl cyclase/cAMP system. Alterations in G-protein levels have been demonstrated in many animal models of hypertension including spontaneously hypertensive rats (SHR). We have previously shown an enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins and their mRNA in hearts and aorta from SHR compared to their age-matched Wistar-Kyoto (WKY) control rats whereas the levels of $G_{s\alpha}$ are unaltered. The enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins precedes the development of hypertension in SHR suggesting a role of enhanced Gi protein expression in the pathogenesis of hypertension. Furthermore, treatment of SHR with captopril (an inhibitor of angiotensin converting enzyme) restored the enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins towards control levels suggesting a role for angiotensin II (Ang II) in enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in SHR. In addition, increased oxidative stress has been shown in SHR which may be attributed to the increased levels of Ang II in SHR. Furthermore, the implication of the MAPK pathway in Ang II-induced enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) has been shown and oxidative stress has been shown to increase MAPK signalling. The present studies were undertaken in order to examine if oxidative stress is a contributing factor in enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins and SHR and whether the effects of oxidative stress are mediated through the MAPK pathway. VSMC from aorta of 12 week-old SHR and age-matched WKY rats were used for these experiments.

The levels of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins were increased in VSMC from SHR compared to VSMC from WKY rats whereas the levels of $G_{s\alpha}$ were unchanged as determined by immunoblotting techniques. Treatment of VSMC from SHR with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC) or diphenyleneiodonium (DPI) restored the enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins towards WKY levels. The enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in VSMC from SHR was also reflected in enhanced adenylyl cyclase inhibition by Ang II and C-ANP₄₋₂₃ (a ring-deleted analog of atrial natriuretic peptide), as well as increased inhibition of forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity by low concentrations of $GTP\gamma S$. In addition, $GTP\gamma S$, isoproterenol and sodium fluoride (NaF)-mediated stimulation of adenylyl cyclase was significantly diminished in VSMC from SHR compared to WKY. Furthermore, the enhanced inhibition and attenuated stimulation of adenylyl cyclase in VSMC from SHR were restored towards control WKY levels by NAC and DPI. In addition, PD98059, a specific inhibitor of MAPK, restored the enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in VSMC from SHR towards WKY levels. In addition, VSMC from SHR exhibited an increased phosphorylation state of ERK 1/2 in which was restored towards WKY levels by NAC or DPI. These results suggest that oxidative stress may be a contributing factor in enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in SHR and its effect may be exerted through MAPK activation.

Key Words: Adenylate cyclase, G proteins, hypertension, MAPK, oxidative stress.

Table des matières

| | |
|------------------------|------|
| Dedicace | iii |
| Remerciements | iv |
| Résumé | v |
| Summary | vii |
| Table des matières | ix |
| Liste des figures | xiii |
| Liste des tableaux | xv |
| Liste des abréviations | xvi |

Chapitre 1. Introduction: Revue de la littérature

I. Voies de signalisation transmembranaires (RCPG)

| | |
|---|----|
| A. Introduction | 2 |
| B. Système adénylate cyclase/AMPc | 2 |
| B.1 Récepteurs couplés aux protéines G | 3 |
| B.1.1 Structure | 3 |
| B.1.2 Fonction | 5 |
| B.1.3 Désensibilisation | 7 |
| B.1.4 Dimérisation des récepteurs | 8 |
| C. Protéines G | 9 |
| C.1 Structure | 9 |
| C.2 Fonction et régulation des protéines G | 10 |
| C.3 Interaction des protéines G avec les RCPG | 10 |

| | | |
|-----------------------------|--|-----------|
| C.4 | Intéraction des protéines G avec l'adénylate cyclase | 12 |
| C.5 | Fonctions du complexe $\beta\gamma$ | 12 |
| C.6 | Modifications covalentes des protéines G | 13 |
| C.6.1 | Modification par des toxines bactériennes | 13 |
| C.6.2 | Modifications lipidiques | 14 |
| D. | Adénylate cyclase | 15 |
| D.1 | Structure de l'adénylate cyclase | 15 |
| D.2 | Fonction et régulation | 17 |
| E. | Voie de signalisation des MAPK | 19 |
| E.1 | Signalisation par ERK 1/2 | 19 |
| II. Hypertension | | |
| A. | Pression artérielle | 21 |
| B. | Régulation de la pression artérielle | 21 |
| B.1 | Mécanismes de régulation à court terme | 22 |
| B.1.1 | Réflexes déclenchés par les barorécepteurs | 22 |
| B.1.2 | Réflexes déclenchés par les chimiorécepteurs | 23 |
| B.1.3 | Mécanismes chimiques | 24 |
| B.1.3.1 | Hormones de la médulla surrénale | 24 |
| B.1.3.2 | Peptide natriurétique auriculaire | 24 |
| B.1.3.3 | Hormone antidiurétique | 25 |
| B.1.3.4 | Angiotensine II | 25 |
| B.1.3.5 | Monoxyde d'azote | 25 |
| B.2 | Mécanismes de régulation à long terme | 25 |

| | |
|---|----|
| C. Conséquences de l'hypertension | 26 |
| C.1 Conséquences pour le cœur | 26 |
| C.2 Conséquences sur la vasculature | 27 |
| C.3 Conséquences sur les reins | 27 |
| D. Traitements pharmacologiques de l'hypertension | 27 |
| E. Un modèle d'hypertension animal : SHR | 28 |
| III. Stress oxydatif | |
| A. Structure des espèces réactives oxygénées | 29 |
| B. Sources de production des espèces réactives oxygénées | 30 |
| B.1 Chaîne respiratoire mitochondriale | 30 |
| B.2 NAD(P)H oxydase | 31 |
| B.3 Xanthine oxydase | 32 |
| B.4 Nitric oxide synthase endothéliale | 32 |
| B.5 Source non-enzymatique | 32 |
| C. Voies d'élimination des espèces réactives oxygénées | 33 |
| C.1 Superoxyde dismutase | 33 |
| C.2 Molécules antioxydantes et autres enzymes | 34 |
| D. Effets physiologiques des espèces réactives oxygénées | 36 |
| D.1 Effets dans le système cardiovasculaire | 36 |
| D.2 Effets dans le système immunitaire | 36 |
| D.3 Autres effets | 37 |
| E. Effets pathologiques des espèces réactives oxygénées | 37 |

IV. Altérations du système adénylate cyclase/AMPC dans l'hypertension 39

V. Objectifs 42

**Chapitre 2. Oxidative stress contributes to the enhanced expression of
Gi α proteins and adenylyl cyclase signalling in vascular smooth muscle
cells from spontaneously hypertensive rats**

| | |
|-----------------------------|----|
| Abstract | 44 |
| Introduction | 45 |
| Materials and Methods | 47 |
| Results | 51 |
| Discussion | 56 |
| References | 61 |
| Figure legends | 67 |
| Figures | 73 |

Chapitre 3. Discussion générale et conclusion

Discussion 85

Conclusion et perspectives 89

Références 91

Liste des Figures

Chapitre 1

| | |
|---|----|
| Figure 1: Voie de signalisation adénylate cyclase/AMPc | 4 |
| Figure 2 : Structure d'un récepteur couplé aux protéines G | 6 |
| Figure 3 : Cycle d'activation/d'inactivation des protéines G | 11 |
| Figure 4 : Structure de l'adénylate cyclase | 16 |
| Figure 5 : Voie de signalisation des MAPK | 20 |
| Figure 6 : Voies de production et d'élimination des espèces réactives oxygénées | 35 |

Chapitre 2

| | |
|---|----|
| Figure 1: Film représentatif de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ (A), $G_{i\alpha-3}$ (B) et $G_{s\alpha}$ (C) dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 73 |
| Figure 2: Effet de NAC sur l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 74 |
| Figure 3: Effet de NAC sur l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 75 |
| Figure 4: Effet de faibles concentrations de $GTP\gamma S$ sur l'activité de l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 76 |

| | |
|---|----|
| Figure 5: Effet de l'AngII sur l'activité de l'adénylate cyclase dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 77 |
| Figure 6: Effet du C-ANP ₄₋₂₃ sur l'activité de l'adénylate cyclase dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 78 |
| Figure 7: Effet du GTP γ S sur l'activité de l'adénylate cyclase dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 79 |
| Figure 8: Effet de l'isoprotérénol (A) et du fluorure de sodium (B) sur l'activité de l'adénylate cyclase dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 80 |
| Figure 9: Effet du PD98059 sur l'expression des protéines Gi α -2 and Gi α -3 dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 81 |
| Figure 10: Effet du NAC et du DPI sur la phosphorylation de ERK 1/2 dans les CMLV de rats SHR et WKY de 12 semaines | 82 |
| Figure 11 : Représentation schématique de mécanismes possibles impliquant l'AngII, le stress oxydatif et la voie des MAPK dans l'augmentation de l'expression des protéines Gi α dans l'hypertension | 83 |

Liste des tableaux

Chapitre 1

| | |
|--|----|
| Tableau I: Distribution et régulation des différentes isoformes de l'adénylate cyclase | 18 |
|--|----|

Liste des abréviations utilisées

| | |
|-----------------|--|
| 1K-1C | Modèle de rat hypertendu <i>one kidney-one clip</i> |
| ADH | <i>Anti-diuretic hormone</i> |
| Ang II | Angiotensine II |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| AT1 | <i>Angiotensine receptor 1</i> |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| CMLV | Cellules musculaires lisses vasculaires |
| DOCA-sel | Rats traités au sel du déoxycorticostérone |
| ECA | Enzyme de conversion de l'angiotensine |
| ERK | <i>Extracellular signal regulated kinase</i> |
| ERO | Espèces réactives oxygénées |
| GABA | γ -aminobutyric acid |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| Gi | Protéine régulatrice liant les nucléotides guanylés inhibitrice |
| Gi α | Sous-unité alpha de Gi |
| GMPc | Guanosine monophosphate cyclique |
| Gs | Protéine régulatrice liant les nucléotides guanylés stimulatrice |
| Gs α | Sous-unité alpha de Gs |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| GTP γ S | Guanosine 5'-O-thiotriphosphate |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphate |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |

| | |
|------------------|--|
| MAPKK | MAPK kinase |
| MAPKKK | MAPKK kinase |
| MEK | MAP/ERK kinase |
| MLCK | <i>Myosin light-chain kinase</i> |
| NAD ⁺ | nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée) |
| NADP | nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (forme oxydée) |
| NAF | Fluorure de sodium |
| PKA | Protéine kinase A |
| PNA | Peptide natriurétique auriculaire |
| RCPG | Récepteur couplé aux protéines G |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SHR | <i>Spontaneously hypertensive rats</i> |
| SOD | <i>Superoxide dismutase</i> |
| VSMC | <i>Vascular smooth muscle cells</i> |
| WKY | <i>Wistar-Kyoto</i> |

Chapitre 1

Introduction

Revue de la littérature

I. Voies de signalisation transmembranaires (RCPG)

A. Introduction

La signalisation transmembranaire joue un rôle important dans le bon fonctionnement des cellules (Alberts et Bray 1989). Il existe trois classes de récepteurs protéiques de surface, soit les RCPG, les récepteurs couplés aux canaux et les récepteurs couplés à une activité enzymatique (tyrosine-kinase). Dans le cadre de ce mémoire, les RCPG seront discutés seulement. De façon générale, un ligand extracellulaire se lie à un récepteur situé dans la membrane plasmique et ce récepteur active une protéine transductrice (protéine G), qui elle va activer à son tour un effecteur (enzyme, canal ionique). Si la protéine G interagit avec un canal ionique, celui-ci sera activé ou fermé. Si la protéine G active une enzyme (adénylate cyclase, phospholipase), l'enzyme produira un second messenger (AMPc, IP₃, diacylglycérol). Le second messenger va à son tour activer un effecteur secondaire comme la protéine kinase A (PKA) qui à son tour va phosphoryler différentes cibles intracellulaires afin d'induire une réponse physiologique. Parmi les voies de signalisation transmembranaires, il y a le système adénylate cyclase/AMPc, le système guanylate cyclase/GMPc et le système phosphoinotiside/Ca²⁺/protéine kinase C, entre autres. La voie de l'adénylate cyclase/AMPc est une des voies de signalisation les plus étudiées et sera vue plus en détails ci-bas (Alberts et al. 1989). De plus, la voie des MAPK sera aussi vue car elles seront étudiées dans le cadre de ce mémoire.

B. Système adénylate cyclase/AMPc

Le système adénylate cyclase/AMPc est composé de trois éléments : 1) un récepteur; 2) une protéine régulatrice liant le GTP (protéine G); 3) l'adénylate cyclase. Chaque

élément de cette voie de signalisation joue un rôle vital afin d'assurer qu'un signal extracellulaire est reçu, communiqué vers l'intérieur et interprété correctement. S'il y a une erreur de transmission à cause d'une déficience ou d'un mauvais fonctionnement d'un des éléments, la survie de la cellule est compromise. Les signaux extracellulaires sont perçus par des récepteurs membranaires qui se chargent de transmettre le signal vers l'intérieur de la cellule. Le signal n'a pas besoin de pénétrer dans la cellule pour exercer ses fonctions. La voie de l'adénylate cyclase/AMPC fonctionne de la façon suivante : 1) liaison du signal au récepteur membranaire; 2) activation d'une protéine G; 3) activation de l'adénylate cyclase par la protéine G; 4) formation du second messenger AMPC; 5) activation de PKA par l'AMPC et réponse physiologique. Il est à noter qu'un récepteur peut activer plusieurs protéines G qui peuvent activer plusieurs molécules d'adénylate cyclase qui peuvent former beaucoup d'AMPC pour activer plusieurs molécules de PKA. On appelle ceci une cascade de signalisation (figure 1).

B.1 Récepteurs couplés aux protéines G

B.1.1 Structure

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent une des plus importantes familles de récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont activés entre autres par des hormones, des neurotransmetteurs, de la lumière, des odorants et par du calcium (Vazquez-Prado et al. 2003). Chez les vertébrés, cette famille contient plus de 2000 membres et représente environ 1% du génome (Breitwieser 2004). Les RCPG ont une structure similaire. Ces récepteurs sont formés par une chaîne polypeptidique qui traverse

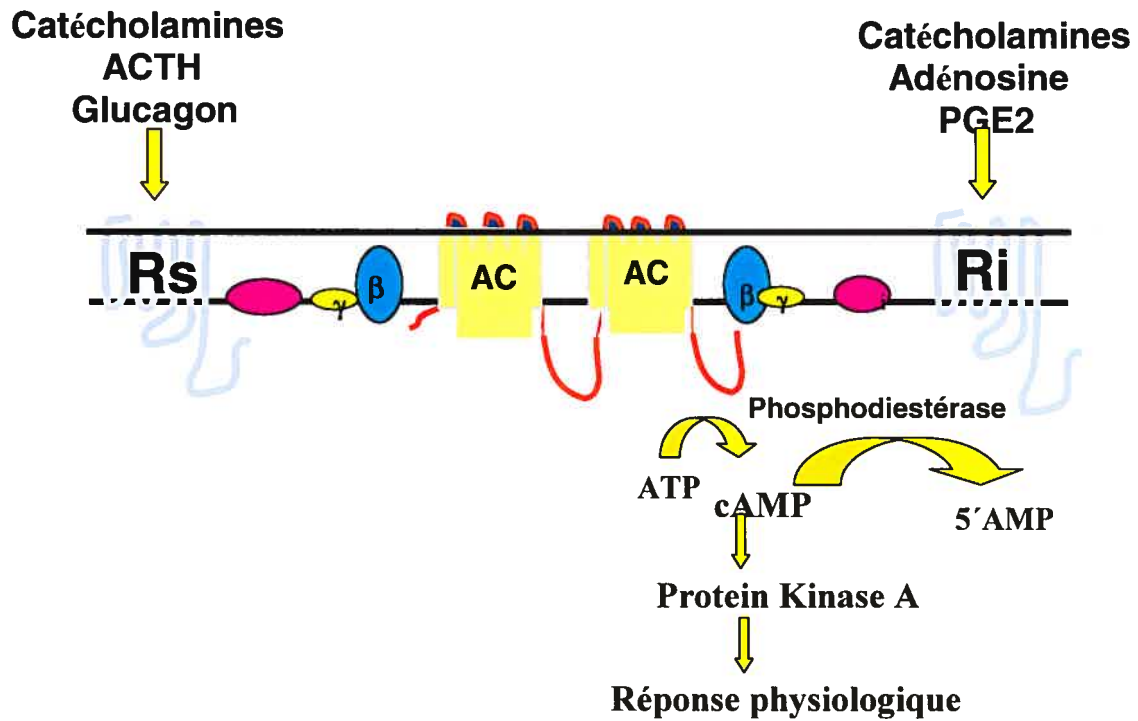


Figure 1. Voie de signalisation adénylate cyclase/AMPc

Légende :

α_s, α_i : sous-unité α couplée soit à Gs (α_s) ou à Gi (α_i)

AC : Adénylate cyclase

β, γ : sous-unité des protéines G

Rs, Ri : Récepteur couplé soit à Gs (Rs) ou à Gi (Ri)

la membrane plasmique sept fois. Ces sept hélices transmembranaires (20 à 25 acides amines chacune) sont reliées entre-elles par trois boucles intracellulaires (i1, i2, i3) et par trois boucles extracellulaires (e1, e2, e3). Le domaine N-terminal est extracellulaire tandis que le domaine C-terminal est intracellulaire (figure 2). Deux résidus cystéine (un dans e1 et l'autre dans e2) sont conservés dans la plupart des récepteurs couplés aux protéines G et forment un pont disulfure qui est important pour la stabilité du récepteur et pour la translocation à la membrane plasmique à partir de l'appareil de Golgi (Bockaert and Pin 1999). Tous les RCPG sont des glycoprotéines et possèdent au moins une séquence commune pour la N-glycosylation dans les domaines extracellulaires (Gudermann et Nürnberg 1995).

B.1.2 Fonction

Chaque RCPG possède un domaine de liaison de ligand qui est spécifique pour seulement 1 ligand (Gudermann et Nürnberg 1995). Toutefois, différents domaines de liaison du ligand de différents sous-types de récepteurs peuvent lier le même ligand. Comme mentionné plus haut, il existe une grande variété de ligands qui peuvent activer ces récepteurs en se liant aux domaines de liaison du ligand. Une fois qu'un ligand est lié à son domaine de liaison, les RCPG activent une protéine G afin que la cascade de signalisation se propage. Il existe dans les RCPG un domaine d'interaction avec les protéines G. Ce domaine se trouve au niveau des segments transmembranaires 5 et 6 ainsi que dans la boucle intracellulaire i3 (Dohlman et al. 1991).

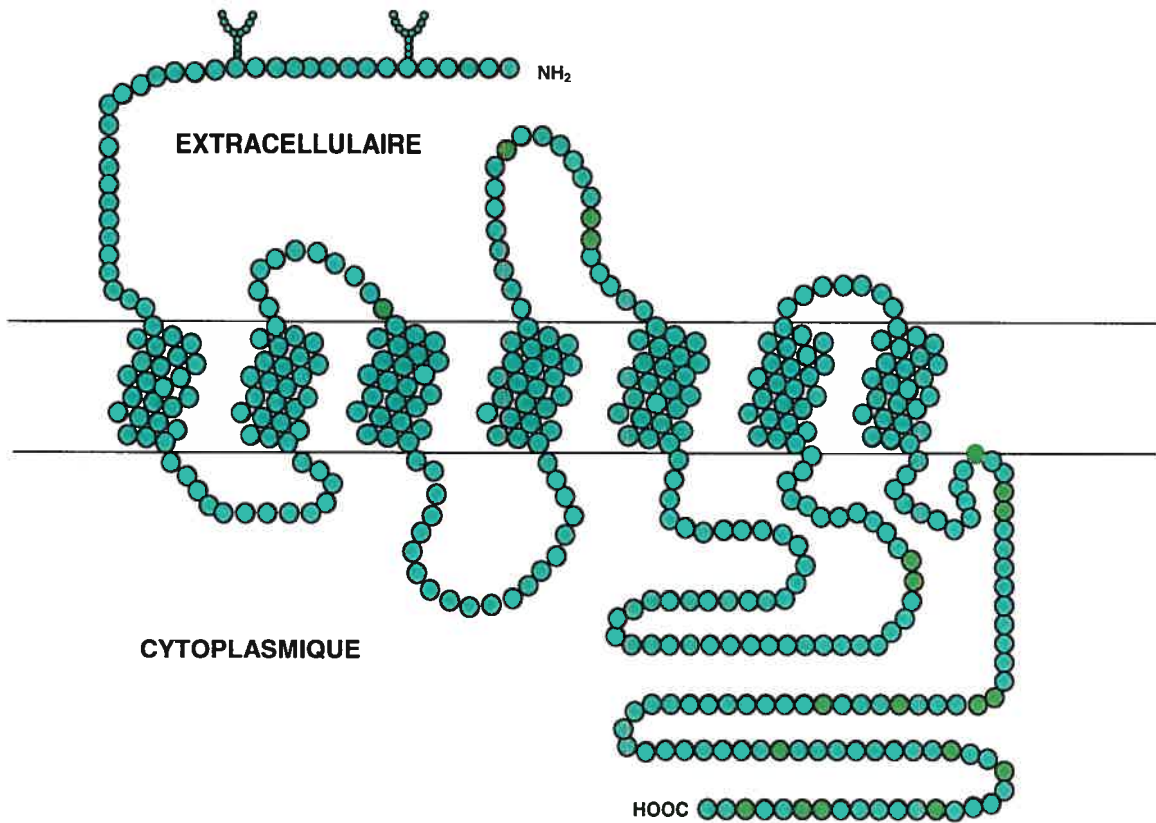


Figure 2. Structure d'un récepteur couplé aux protéines G

Adapté de Johnson M, 1998

B.1.3 Désensibilisation

Lorsqu'un récepteur est stimulé par un ligand pour une assez longue période de temps, la réponse du récepteur diminue. Ce phénomène est connu comme étant la désensibilisation. Pour faire un parallèle, ce phénomène est identique au fait que lorsque vous portez une montre sur votre bras, vous ne la sentez plus après un certain temps, parce que les récepteurs du toucher ne répondent plus. Il existe deux catégories de désensibilisation : homologue et hétérologue. La désensibilisation homologue est la désensibilisation des RCPG qui sont activés tandis que la désensibilisation hétérologue est la désensibilisation de tout RCPG lorsqu'un autre sous-type de RCPG est activé. (Bunemann et al. 1999). Par exemple, l'activation d'un récepteur α -adrénergique pourrait aboutir non seulement à la désensibilisation de ce dernier, mais aussi à la désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques. Il existe trois mécanismes par lesquels les RCPG sont désensibilisés. Ces mécanismes sont la phosphorylation, l'internalisation du récepteur et la séquestration du récepteur. Dans ce dernier cas, le récepteur est dégradé (Kohout and Lefkowitz 2003, Toews et al. 2003).

Lorsqu'un RCPG est activé par un ligand, le récepteur adopte une conformation lui permettant d'être phosphorylé par les *G-protein receptor kinases* (GRK) dans son domaine cytoplasmique (boucles intracellulaires et domaine C-terminal). Lorsque le récepteur est phosphorylé par une GRK, l'affinité du récepteur pour la protéine G est diminuée, donc la cascade ne peut se poursuivre (Kohout and Lefkowitz 2003). De plus, le récepteur phosphorylé peut interagir avec une famille de protéines appelées arrestines. La liaison d'une arrestine avec le récepteur diminue encore plus l'affinité de ce dernier

pour la protéine G qui lui est couplée (Attramadal et al. 1992, Lohse et al. 1992). Outre les GRK, les RCPG peuvent aussi être phosphorylés par les protéines kinases A et C (Kohout and Lefkowitz 2003), mais la phosphorylation par ces kinases n'aboutit pas toujours à la liaison d'une arrestine (Bunemann and Hosey 1999).

Le deuxième mécanisme de désensibilisation est l'internalisation du récepteur. Il existe plusieurs mécanismes responsables de l'internalisation (Bunemann and Hosey 1999). Le mécanisme le plus connu est celui impliquant les GRK et les arrestines. La liaison d'une arrestine favorise le recrutement de la machinerie de l'endocytose, soit la formation de puits de clathrine. Toutefois, pas tous les RCPG sont internalisés de cette façon (Bunemann et al. 1999).

Le troisième mécanisme de désensibilisation est la séquestration du récepteur. Le mécanisme exact qui mène à la dégradation du récepteur n'est pas connu, mais semble impliquer le domaine C-terminal du récepteur (Toews et al. 2003). En effet, Wang et al. ont montré que lorsqu'il y a mutation de Cys-365 ou de Ser-369 en alanine dans le récepteur $\alpha_1\beta$ -adrénergique de cobaye, la dégradation du récepteur est abolie (Wang et al. 2000).

B.1.4 Dimérisation des récepteurs

La pensée traditionnelle est que les RCPG sont des monomères. Mais de plus en plus d'études montrent que la majorité des RCPG forment des dimères (Breitwieser 2004, Salahpour et al. 2004, Breit et al. 2004). La dimérisation pourrait être utile pour le bon fonctionnement du récepteur. Un bon exemple est l'hétérodimère formé par les récepteurs

du GABA, GABA_A et GABA_B (Balasubramanian et al. 2004) . Le récepteur GABA_B ne peut pas être transloqué à la membrane plasmique tandis que le récepteur GABA_A peut être transloqué vers la membrane plasmique, mais ne peut initier la cascade de signalisation. Donc, si ces récepteurs sont exprimés seuls, il n'y aura aucune activité de GABA détectée. Mais si les deux récepteurs sont co-exprimés, la signalisation par GABA sera fonctionnelle (Balasubramanian et al.2004).

C. Protéines G

C.1 Structure

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques liant le GTP ancrées à la membrane plasmique. Elles possèdent une activité GTPase, c'est-à-dire qu'elles catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP. Elles sont responsables de la transduction du signal à partir du récepteur jusqu'à l'adénylate cyclase. Les protéines G sont formées de trois sous-unités : α , β et γ . La spécificité des protéines G est déterminée par la sous-unité α qui lie le GTP tandis que les sous-unités β et γ sont interchangeableables (Gilman 1984, Gilman 1987). Dans la voie de signalisation adénylate cyclase/AMPC, il existe deux classes de protéines G qui peuvent soit activer ou inhiber l'adénylate cyclase. G_s active l'adénylate cyclase tandis que G_i inhibe l'adénylate cyclase par la sous-unité α . Le clonage moléculaire révèle qu'il existe quatre isoformes de G_s α issues de l'épissage différentiel d'un seul gène. Il existe aussi trois isoformes de G_i α issues de trois gènes différents : G_i α -1, G_i α -2, G_i α -3 (Itoh et al. 1988, Robishaw et al. 1988). La taille des sous-unités α varie entre 39 et 52 kDa. La taille des sous-unités β est de 36 kDa et semble être similaire dans toutes les protéines G. Les sous-unités γ sont de petite taille et migrent entre 8 et 11

kDa sur gel SDS-PAGE (Spiegel 1987). Les sous-unités β et γ forment un complexe qui ne se dissocie pas sauf en présence de substances dénaturantes.

C.2 Fonction et régulation des protéines G

Les protéines G agissent comme transducteurs du signal (Figure 3). Lorsque les protéines G sont au repos, c'est le GDP qui est lié à la sous-unité α . Lorsque les protéines G sont activées, la sous-unité α échange le GDP pour du GTP qui se trouve en plus grande concentration dans la cellule. Lorsque la sous-unité α est liée au GTP, elle se dissocie du complexe $\beta\gamma$ et ainsi, active l'adénylate cyclase (G_s) ou l'inhibe (G_i). La sous-unité α possède une activité GTPase lente. Après avoir activé ou inhibé l'adénylate cyclase, la sous-unité α convertit le GTP en GDP et met ainsi fin à son activation. La sous-unité α se réassocie alors avec le complexe $\beta\gamma$ car la sous-unité α possède une plus grande affinité pour le complexe $\beta\gamma$ lorsqu'elle est liée au GDP (Spiegel 1987). Cette réassociation permet d'amorcer de nouveau la cascade de signalisation (figure 3).

C.3 Interaction des protéines G avec les RCPG

Pour être activées, les protéines G doivent être capables d'interagir avec les récepteurs qui leur sont couplés. Au niveau de la sous-unité α , les sept derniers résidus de la région C-terminale sont importants pour l'interaction avec les récepteurs. Des expériences de mutagenèse dirigée montrent que la région C-terminale du récepteur interagit avec la région C-terminale de la sous-unité α de la protéine G. Le complexe $\beta\gamma$ participe aussi à l'interaction de la sous-unité α avec le récepteur. En effet, lorsque les résidus de la sous-unité β qui sont en contact avec la sous-unité α sont mutés en résidus alanine, l'échange

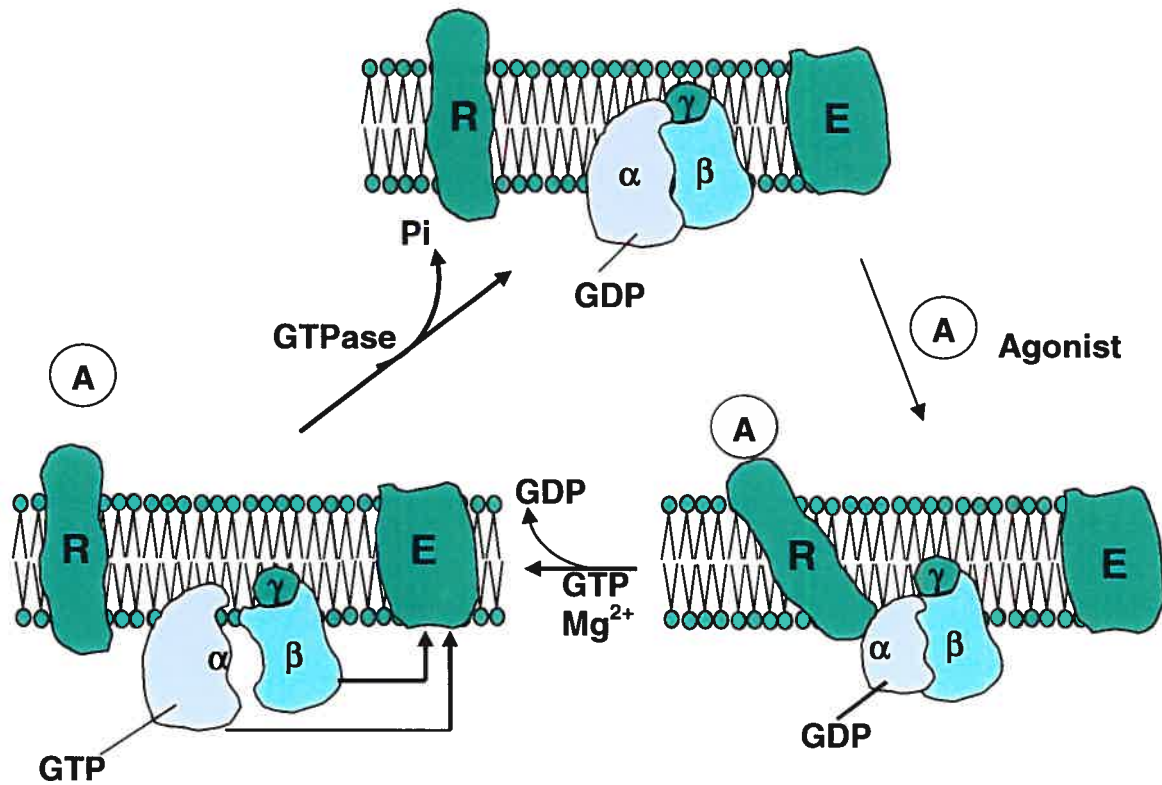


Figure 3. Cycle d'activation/d'inactivation des protéines G

Tiré de Spiegel AM, 1987.

Légende :

α , β , γ : sous-unités des protéines G

E : effecteur

R : récepteur

GDP/GTP dans la sous-unité α ne se fait plus. Ces résultats suggèrent que la sous-unité β maintient la sous-unité α en place afin de permettre la relâche du GDP (Hamm 1998).

C.4 Interaction des protéines G avec l'adénylate cyclase

Une fois que la sous-unité α échange le GDP pour du GTP, elle se détache du complexe $\beta\gamma$ et peut activer (G_s) ou inhiber (G_i) l'adénylate cyclase. Lorsque la sous-unité α est liée à du GTP, il y a un changement de conformation de la sous-unités α qui lui permet d'avoir une affinité de 20 à 100 fois plus avec l'adénylate cyclase que lorsqu'elle est liée au GDP (Hamm 1998).

C.5 Fonctions du complexe $\beta\gamma$

On croyait autrefois que seulement la sous-unité α était capable d'activer des effecteurs. Mais, des études récentes montrent que le complexe $\beta\gamma$ peut aussi activer des effecteurs. Le complexe $\beta\gamma$ ne change pas de conformation lorsqu'il se dissocie de la sous-unité α (Sondek et al. 1996). De plus, la sous-unité α est capable d'inhiber la liaison du complexe $\beta\gamma$ avec ses effecteurs. Ces résultats suggèrent que le site de liaison du complexe $\beta\gamma$ avec la sous-unité α est le même que pour la liaison avec ses effecteurs. Le complexe $\beta\gamma$ peut activer des canaux potassiques, des canaux calciques et des phospholipases (Clapham and Neer 1997). Il est aussi capable d'activer ou d'inhiber certaines isoformes de l'adénylate cyclase (Clapham and Neer 1997).

C.6 Modifications covalentes des protéines G

Toutes les sous-unités des protéines G sont susceptibles aux modifications covalentes dans des conditions normales et pathologiques. Ces modifications ont des conséquences sur l'activité des protéines G ainsi que l'interaction de celles-ci avec d'autres protéines.

C.6.1 Modification par des toxines bactériennes

Certaines maladies bactériennes comme le choléra et la coqueluche sont médiées par des toxines qui sont sécrétées par ces bactéries. Ces toxines modifient de façon covalente les protéines G et ceci a pour conséquence d'activer ou d'inhiber les protéines G. La toxine cholérique, produite par *Vibrio Cholera*, est une protéine de 87 kDa constituée de deux sous-unités A et B dans un rapport 1A :5B. Une fois que la toxine se fixe sur son récepteur cellulaire de surface, qui est le ganglioside G_{M1} , le complexe toxine-récepteur est capté par la cellule par endocytose. La toxine est alors activée par clivage protéolytique et par réduction de ponts disulfures de A, conduisant à deux fragments, A_1 et A_2 . A_1 est libérée dans le cytosol tandis que les sous-unités B ne peuvent pas pénétrer dans la cellule. Une fois dans le cytosol de la cellule, A_1 catalyse le transfert de l'unité ADP-ribose du NAD^+ sur la chaîne latérale d'une arginine de la sous-unité α de G_s ($G_s\alpha$). La protéine $G_s\alpha$ ADP-ribosylée, liée au GTP, peut activer l'adénylate cyclase, mais ne peut pas hydrolyser le GTP pour mettre fin à son activité. $G_s\alpha$ et l'adénylate cyclase sont donc bloquées dans leur état actif (Voet and Voet 1998). Une autre toxine bactérienne capable de modifier les protéines G de façon covalente est la toxine pertussique. La toxine pertussique, produite par *Bordetella pertussis*, est aussi une protéine de type 1A :5B de 76 kDa et possède le même mode d'action que la toxine

cholérique. Cette toxine catalyse le transfert d'une unité ADP-ribose du NAD^+ sur une arginine de la sous-unité α de G_i ($G_{i\alpha}$). Ceci empêche $G_{i\alpha}$ d'échanger son GDP pour GTP, donc $G_{i\alpha}$ reste inactive et est incapable d'inhiber l'adénylate cyclase (Voet and Voet 1998).

C.6.2 Modifications lipidiques

Outre les modifications par des toxines bactériennes, les protéines G peuvent être modifiées de façon covalente dans des conditions normales aussi. Les protéines G subissent des modifications co- et post-traductionnelles lipidiques. Ces modifications sont importantes car elles permettent aux protéines G d'être transloquées à la membrane plasmique et permettent aussi aux protéines G d'interagir avec d'autres protéines. Les modifications majeures sont la N-myristoylation et la palmitoylation.

La N-myristoylation représente l'attachement d'un myristate par un lien amide sur un résidu glycine dans le domaine N-terminal. Cette liaison est irréversible et se produit uniquement chez $G_{i\alpha}$. Cette modification permet l'attachement de la sous-unité α à la membrane plasmique. Des mutations qui empêchent la N-myristoylation préviennent l'attachement de $G_{i\alpha}$ à la membrane plasmique (Chen and Manning 2001). La N-myristoylation augmente aussi l'affinité de $G_{i\alpha}$ pour le complexe $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$). La palmitoylation représente l'attachement d'un groupe palmitate par un lien thioester sur un résidu cystéine dans le domaine N-terminal de $G_{i\alpha}$ et de $G_{s\alpha}$. Cette modification augmente l'affinité de $G_{s\alpha}$ pour $G\beta\gamma$, mais le rôle dans l'interaction de $G_{i\alpha}$ avec $G\beta\gamma$

n'est pas connu. Il semble aussi que la palmitoylation n'est pas essentielle pour l'attachement des $G\alpha$ à la membrane plasmique (Chen and Manning 2001).

D. Adénylate cyclase

D.1 Structure de l'adénylate cyclase

L'adénylate cyclase est une enzyme membranaire qui convertit l'ATP en AMPc. Elle est composée de deux domaines de six passages transmembranaires chacun (M1, M2) qui sont reliés par une boucle hydrophilique cytoplasmique (figure 4). L'élimination de cette boucle hydrophilique abolit l'activité de l'adénylate cyclase (Simonds 1999). Le domaine N-terminal est cytoplasmique et il est du côté du domaine M1 tandis que le domaine C-terminal est aussi cytoplasmique, mais il est du côté du domaine M2 (Krupinski et al. 1991). Il existe 9 isoformes de cette enzyme (types I à IX) dont le nombre d'acides aminés varie entre 1064-1248. Toutes les isoformes possèdent au moins un site de N-glycosylation dans le domaine M2. De plus, toutes les isoformes sont activées par $G\alpha$ et certaines peuvent même être régulées par $G\beta\gamma$. La majorité des isoformes de l'adénylate cyclase sont inhibées par $G\alpha$. Aussi, chaque isoforme a un profil d'expression unique. Par exemple, l'isoforme I est exprimée majoritairement dans le cerveau tandis que l'isoforme VI est exprimée majoritairement dans le cœur, mais toutes les isoformes sont exprimées dans le cerveau (tableau I). Toutes les isoformes sauf l'isoforme IX sont activées par la forskoline, une phytohormone (Simonds 1999).

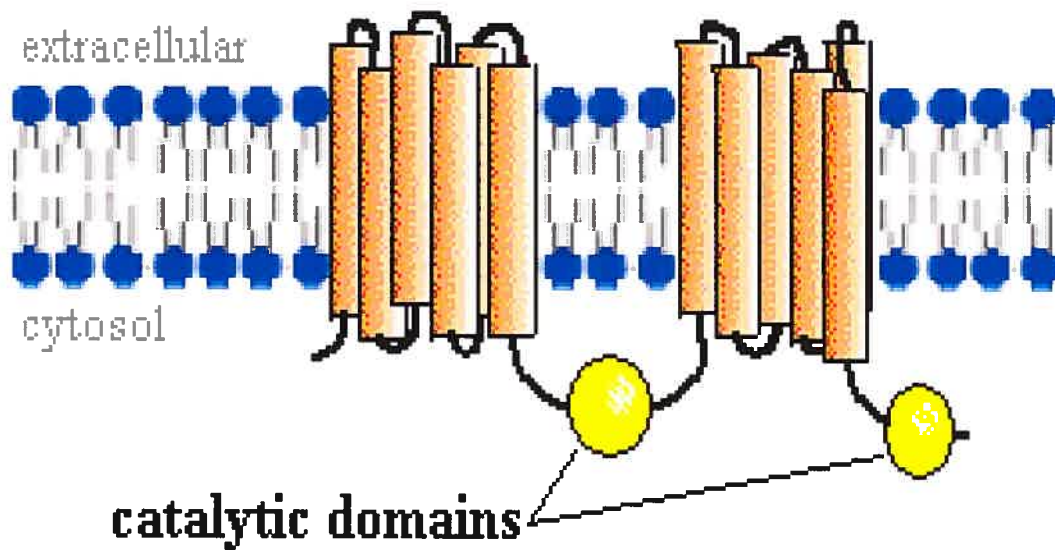


Figure 4. Structure de l'adénylate cyclase

<http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/molecules/cyclase.html>

D.2 Fonction et régulation

Lorsqu'elle est activée, l'adénylate cyclase convertit l'ATP en AMPc. L'AMPc est un second messenger qui active la PKA, qui elle va phosphoryler plusieurs cibles intracellulaires afin d'avoir une réponse physiologique. Parmi ces réponses, il y a la vasorelaxation, la relâche de catécholamines (Tsuda et al. 1997), la dégradation du glycogène (Voet and Voet 1998) et la rétention d'eau par les tubules distaux des reins (Feraille and Doucet 2001). Comme mentionné plus haut, toutes les isoformes sont activées par $G_{s\alpha}$ et seulement l'isoforme IX n'est pas activée par la forskoline. $G_{\beta\gamma}$ et $G_{i\alpha}$ peuvent aussi réguler l'activité de l'adénylate cyclase. D'autres facteurs peuvent aussi réguler l'activité de l'adénylate cyclase. Parmi ces facteurs on retrouve le Ca^{2+} , PKA et PKC (tableau I).

Les ions Ca^{2+} peuvent stimuler ou inhiber l'adénylate cyclase dépendamment de l'isoforme, du tissu et de la concentration des ions. Par exemple, l'isoforme I peut être activée par les ions Ca^{2+} dans le cerveau, mais les ions Ca^{2+} ne peuvent pas activer l'isoforme III en absence de certains effecteurs comme la forskoline *in vitro*. La stimulation de ces deux isoformes requiert la présence de calmoduline. De plus, les ions Ca^{2+} peuvent inhiber les isoformes V et VI sans la calmoduline (Caldwell et al. 1992, Choi et al. 1992, Cooper et al. 1995, tableau I). La PKC peut inhiber l'isoforme VI en phosphorylant certains résidus du domaine N-terminal de la cyclase. En effet, la délétion des résidus qui forment le domaine N-terminal (1-86) abolit l'inhibition par la PKC (Lai et al. 1999, Cooper DMF 2003). De plus, la PKA peut aussi diminuer l'activité de l'isoforme V en la phosphorylant (Iwami et al. 1995).

Tableau I. Distribution et régulation des différentes isoformes de l'adénylate cyclase

| Isoforme | Distribution | Ca ²⁺ | Gβγ | Gα |
|----------|---------------------------------|------------------|-------------|-------------|
| I | Cerveau | Stimulation | Inhibition | Inhibition |
| II | Poumons, cerveau | Aucun effet | ? | Aucun effet |
| III | Épithélium olfactaire, pancreas | Incertain | Aucun effet | ? |
| IV | Ubiquitaire | Aucun effet | Stimulation | Aucun effet |
| V | Coeur, cerveau | Inhibition | Aucun effet | Inhibition |
| VI | Coeur, reins, ubiquitaire | Inhibition | Aucun effet | Inhibition |
| VII | Ubiquitaire | Aucun effet | Stimulation | Aucun effet |
| VIII | Cerveau, pancreas | Stimulation | ? | Inhibition |
| IX | Hypophyse, ubiquitaire | Aucun effet | ? | ? |

La distribution la plus abondante est indiquée. ? = n'a pas été vérifié.

Adapté de Caldwell KK et al, 1992 et de Cooper DMF, 2003

E. Voie de signalisation des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)

Les MAP kinases sont une famille d'enzymes qui forment un réseau intégré de signalisation qui est requis pour diverses fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Kyriakis and Avruch 2001). Ces protéines cytoplasmiques modulent l'activité d'autres protéines intracellulaires en ajoutant un phosphate sur une sérine ou un thréonine de ces protéines. Jusqu'à présent, plus de vingt isoformes de MAPK ont été découvertes (Hommes et al. 2003). Parmi ces isoformes, il y a ERK 1 et ERK 2 (ERK 1/2). Les MAPK sont normalement inactives. Pour être activées, les MAPK doivent être phosphorylées sur quelques résidus thréonine et tyrosine. Cette phosphorylation se fait par des kinases des MAPK (MAPKK). Ces MAPKK sont aussi activées par des kinases des MAPKK comme la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3-K) (figure 5). Une fois les MAPK activées, elles vont phosphoryler des facteurs de transcription comme c-jun et c-fos présents dans le cytoplasme ou dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes (Lewis et al. 1998).

E.1 Signalisation par ERK 1/2

Le module ERK fut la première cascade de la voie des MAPK à être caractérisée. ERK est impliqué dans la croissance cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire. Il existe deux isoformes de ERK, soit ERK 1 et ERK 2 qui sont aussi connues comme p42/p44 (Boulton et al. 1990, Boulton et al. 1991). L'activation de ERK 1/2 dépend des MAPKK MEK1 et MEK2. ERK1/2 est important pour la survie. En effet, lorsque MEK1 est inactivé dans des embryons de souris, l'embryon meurt (Pearson et al. 2001).

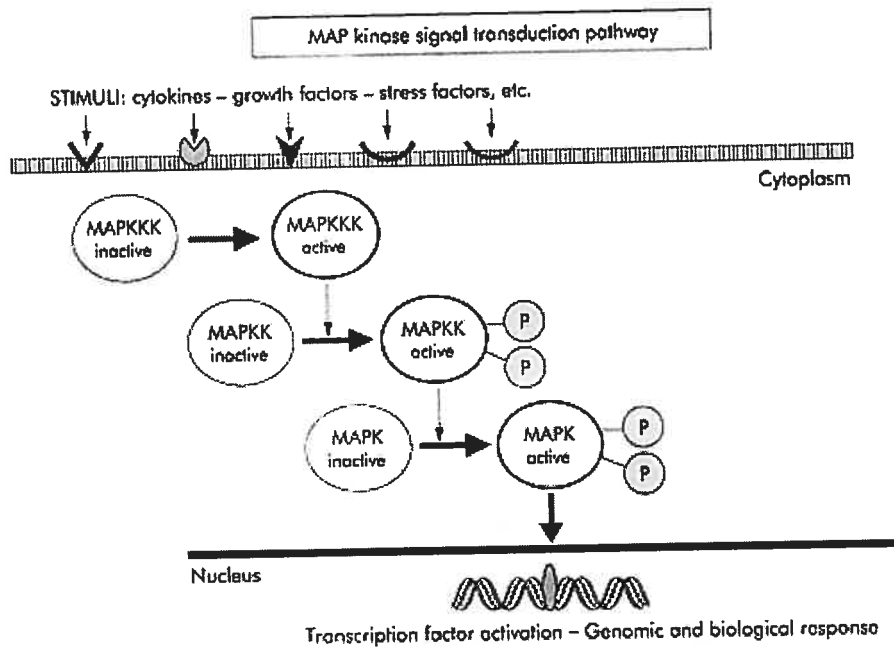


Figure 5. Voie de signalisation des MAPK.

Tiré de Hommes et al, 2003.

II. Hypertension

Il est estimé que plus de 50 millions d'américains font de l'hypertension. L'hypertension est définie comme étant une pression élevée chronique au-dessus de 140/90 mm Hg. L'hypertension est néfaste pour la santé si elle n'est pas traitée à cause de ses effets sur les vaisseaux, les fonctions rénale, cardiaque et cérébrale. En effet, environ 800 000 décès aux Etats-Unis chaque année sont attribués à l'hypertension. L'hypertension constitue un problème scientifique complexe car dans 95% des cas, la cause de l'élévation de la pression n'est pas connue (Lilly 2003).

A. Pression artérielle

Dans la plupart des mammifères, la pression artérielle moyenne est maintenue constante entre 75 et 100 mm Hg. La pression artérielle varie grandement pendant chaque cycle cardiaque. La pression la plus élevée est atteinte pendant la systole et elle est appelée pression systolique. La pression artérielle atteint ses plus bas niveaux pendant la diastole et est appelée pression diastolique.

B. Régulation de la pression artérielle

La pression artérielle est déterminée par le produit du débit cardiaque et de la résistance totale périphérique (Marieb 1999). Le débit cardiaque est le produit du volume d'éjection et de la fréquence cardiaque. La résistance totale périphérique est la force qui s'oppose à l'écoulement du sang et elle résulte de la friction du sang sur la paroi du vaisseau. Trois facteurs peuvent influencer la résistance périphérique, soit la viscosité du sang, la longueur totale des vaisseaux et le diamètre des vaisseaux. Puisque le nombre de globules

rouges ainsi que la longueur totale des vaisseaux sont normalement constants, c'est le diamètre du vaisseau qui influence grandement la résistance totale périphérique. Une augmentation d'une de ces valeurs, que ce soit le débit cardiaque ou la résistance totale périphérique, augmentera donc la pression artérielle. La régulation de la pression artérielle est essentielle afin de s'assurer d'un bon apport de nutriments et d'oxygène aux tissus. C'est pour cela que l'organisme est pourvu de plusieurs mécanismes de régulation qui agissent à court terme et à plus long terme (Marieb 1999).

B.1 Mécanismes de régulation à court terme

B.1.1 Réflexes déclenchés par les barorécepteurs

Les barorécepteurs sont situés dans les sinus carotidiens et dans la crosse de l'aorte. Comme leur nom l'indique, ils sont sensibles aux variations de pression artérielle. Lorsque la pression artérielle s'élève, ces récepteurs sont étirés et ils transmettent des influx nerveux de façon plus fréquente au centre vasomoteur. Les barorécepteurs des sinus carotidiens transmettent leurs influx via le nerf glossopharyngien jusqu'au centre vasomoteur, tandis que les barorécepteurs de la crosse de l'aorte transmettent leurs influx via le nerf vague. Cette augmentation d'influx nerveux inhibe le centre vasomoteur. Le centre vasomoteur est le centre nerveux qui régit les changements de diamètre des vaisseaux sanguins. C'est un amas de neurones sympathiques situé dans le bulbe rachidien. Le centre vasomoteur transmet des influx à un rythme constant le long des fibres efférentes du système nerveux sympathique qui innervent la couche de muscle lisse des vaisseaux sanguins afin de les contracter. Puisque le centre vasomoteur se trouve maintenant inhibé, il y aura diminution de la contraction des vaisseaux et chute de la

pression artérielle. Les influx provenant des barorécepteurs atteignent aussi le centre cardiaque où il y a stimulation du système parasympathique et inhibition du système sympathique. Ceci cause une baisse de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque pour aboutir à une baisse de pression artérielle. Le contraire se produit lorsque la pression artérielle chute, c'est-à-dire diminution d'influx nerveux jusqu'au centre vasomoteur et augmentation de l'activité du centre vasomoteur et plus grande vasoconstriction.

La fonction des barorécepteurs à action rapide est d'empêcher les variations de pression soudaines qui se produisent lorsqu'on passe de la position assise à la position debout par exemple. Le réflexe du sinus carotidien protège l'apport de sang à l'encéphale, tandis que le réflexe de la crosse de l'aorte contribue à maintenir la pression artérielle dans l'ensemble de la circulation systémique. Toutefois, les barorécepteurs sont inefficaces face aux changements de pression prolongés comme en témoigne l'existence de l'hypertension. Ils sont capables d'ajuster leur valeur de référence à un seuil plus élevé que la normale (Marieb 1999).

B.1.2 Réflexes déclenchés par les chimiorécepteurs

Les chimiorécepteurs sont localisés dans la crosse de l'aorte et dans le glomus carotidien. Ils sont situés à proximité des barorécepteurs. Les chimiorécepteurs fonctionnent essentiellement de la même façon que les barorécepteurs, c'est-à-dire en transmettant des influx nerveux au centre vasomoteur, sauf qu'au lieu d'être sensibles aux variations de pression, ils sont sensibles au pH et à la concentration d'oxygène sanguine. Lorsque la teneur en oxygène ou le pH sanguin diminuent brusquement ou que les concentrations de

gaz carbonique augmentent, les chimiorécepteurs transmettent des influx nerveux au centre vasomoteur, provoquant une vasoconstriction réflexe. Cette vasoconstriction réflexe accélère le retour de sang vers le cœur et aux poumons afin d'éliminer le gaz carbonique et capter plus d'oxygène (Marieb 1999).

B.1.3 Mécanismes chimiques

À part des réflexes nerveux qui régulent les variations brusques de pression artérielle, il existe plusieurs médiateurs chimiques qui agissent directement sur les CMLV ou sur le centre vasomoteur. Parmi ces agents, les plus importants sont des hormones (Marieb 1999).

B.1.3.1 Hormones de la médulla surrénale

En période de stress, la glande surrénale libère dans le sang la noradrénaline et l'adrénaline, deux substances qui activent le système sympathique. La noradrénaline a un effet vasoconstricteur, tandis que l'adrénaline augmente le débit cardiaque. Le résultat final est une augmentation de la pression artérielle.

B.1.3.2 Peptide natriurétique auriculaire (PNA)

Les oreillettes du cœur produisent une hormone peptidique, soit le PNA qui est libéré suite à la distension des oreillettes créé par l'augmentation de la pression artérielle (augmentation du retour veineux et du débit cardiaque). Ce peptide stimule l'excrétion

de sodium et d'eau, diminuant ainsi le volume sanguin et par conséquent, la pression artérielle. De plus, le PNA produit une vasodilatation.

B.1.3.3 Hormone antidiurétique (ADH)

L'hormone antidiurétique est sécrétée par l'hypothalamus et elle diminue la diurèse (formation d'urine). Elle est libérée en grande quantité lorsque la pression artérielle chute de manière dangereuse comme dans une hémorragie. Elle provoque aussi une vasoconstriction.

B.1.3.4 Angiotensine II (Ang II)

L'Ang II est produite lorsque les reins libèrent de la rénine pour contrer une baisse de la perfusion rénale. L'Ang II cause une vasoconstriction intense et stimule la libération d'aldostérone. L'aldostérone provoque une rétention de sel et d'eau, ce qui augmente le volume sanguin et la pression artérielle.

B.1.3.5 Monoxyde d'azote

Lorsque le débit sanguin s'accélère, il y a libération du monoxyde d'azote par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Le monoxyde d'azote cause une vasodilatation.

B.2 Mécanismes de régulation à long terme

Les barorécepteurs réagissent aux variations de pression artérielle transitoires et ils sont capables d'ajuster leur seuil de normalité à un niveau plus élevé lorsqu'ils sont exposés à des pressions élevées chroniques. C'est pour cela que notre organisme est pourvu d'un

système de régulation à long terme qui joue sur le volume sanguin. Le volume sanguin est régulé par les reins. Le volume sanguin est un déterminant important du débit cardiaque car il influe sur la pression veineuse et le retour veineux au cœur et finalement sur le volume d'éjection et par conséquent, la pression artérielle. Les reins contrôlent le volume sanguin par un mécanisme direct et par un mécanisme indirect. Dans le mécanisme direct, lorsque la pression artérielle ou le volume sanguin augmentent, la vitesse à laquelle les liquides passent de la circulation sanguine aux tubules rénaux augmente. Dans ce cas, les reins sont incapables de traiter le filtrat assez rapidement et il y a plus de liquide qui passe dans l'urine et il y a donc une baisse du volume sanguin et de la pression artérielle. Dans le mécanisme indirect, lorsque la pression artérielle diminue, les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire libèrent une enzyme appelée rénine. La rénine se trouve ainsi dans la circulation sanguine et convertit l'angiotensinogène, un peptide sécrété par le foie, en angiotensine I. L'angiotensine I est ensuite convertit en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Les effets d'Ang II ont été discutés plus haut (Marieb 1999, Laragh 1992).

C. Conséquences de l'hypertension

L'hypertension non-traitée peut avoir des conséquences néfastes pour notre santé. L'hypertension a des effets dévastateurs dans plusieurs organes comme le cœur, la vasculature et les reins.

C.1 Conséquences pour le cœur

Une pression artérielle élevée augmente la tension dans la paroi du ventricule gauche. Afin de normaliser la tension, le ventricule gauche s'hypertrophie afin de distribuer la

tension sur une plus grande masse musculaire. Le ventricule gauche s'hypertrophie en augmentant l'épaisseur. On appelle ce type d'hypertrophie, hypertrophie concentrique. Toutefois, des conditions qui augmentent la pression artérielle en augmentant le volume sanguin causent un autre type d'hypertrophie, soit l'hypertrophie eccentric. Ce type d'hypertrophie est caractérisé par un élargissement du volume du ventricule gauche sans avoir une conséquence sur l'épaisseur de la paroi. Quoique au début l'hypertrophie est un mécanisme d'adaptation, l'hypertrophie peut éventuellement mener à l'insuffisance cardiaque.

C.2 Conséquences sur la vasculature

Une pression artérielle élevée peut éventuellement causer un éclatement de certains vaisseaux (surtout les capillaires) à cause d'une plus forte pression qui s'exerce sur leur paroi.

C.3 Conséquences sur les reins

Une pression artérielle élevée cause une hypertension rénale qui peut mener à l'insuffisance rénale en causant des dommages à la vasculature rénale. Les CMLV peuvent s'hypertrophier et les capillaires peuvent éclater. Par conséquent, les reins ne sont plus capables de réguler le volume sanguin, ce qui contribue encore plus au maintien de l'hypertension.

D. Traitements pharmacologiques de l'hypertension

Il existe plusieurs médicaments pour traiter l'hypertension. Ces médicaments sont utiles lorsque des changements dans notre style de vie comme cesser de fumer, manger moins

de sel, faire de l'exercice sont inefficaces pour réduire notre pression artérielle à une valeur normale. Il existe plusieurs types de drogues anti-hypertensives qui sont divisés selon leur mode d'action. La première classe est formée des diurétiques. Les diurétiques sont des drogues qui agissent au niveau des tubules rénaux afin de diminuer le volume sanguin en augmentant l'excrétion d'eau et de sel. D'autres drogues comme les agents sympatholytiques agissent en bloquant le système nerveux sympathique. Ainsi, ces drogues parviennent à diminuer la fréquence cardiaque et le débit cardiaque. D'autres drogues comme les bloqueurs des canaux calciques causent une vasodilatation directe des vaisseaux et diminuent ainsi la résistance périphérique totale. Finalement, il existe des drogues qui agissent en bloquant le système rénine-angiotensine. Ces drogues incluent les inhibiteurs de l'ECA qui inhibent la formation d'Ang II à partir de l'angiotensine I et les antagonistes AT1 qui empêchent l'Ang II de se lier à son récepteur et exercer ses effets. Donc, il y aura une diminution de la contraction des vaisseaux et une augmentation de l'excrétion de sel car il y aura diminution de la relâche d'aldostérone par Ang II (Lilly 2003).

E. Un modèle d'hypertension animal : *Spontaneously hypertensive rats (SHR)*

L'hypertension peut être induite de façon expérimentale chez des animaux de plusieurs façons. Par exemple, l'hypertension peut être induite en perfusant des animaux avec des agents constricteurs ou en augmentant la quantité de sel dans leur diète. Par contre, ces modèles d'hypertension ne sont pas de bons modèles d'hypertension spontanée qui est analogue à l'hypertension essentielle humaine. C'est pour cela que le modèle SHR fut créé. Le modèle SHR a été obtenu en croisant un rat mâle Wistar qui avait une pression

artérielle élevée persistante avec une femelle Wistar avec une pression artérielle légèrement supérieure à la moyenne pour obtenir la génération F1. Par la suite, deux rats de la génération F1 qui avait une hypertension spontanée ont été croisés et ainsi de suite afin d'obtenir une génération où 100% des rats développaient l'hypertension spontanée. Les SHR sont caractérisés par une hypertension qui apparaît spontanément autour de 5 semaines et augmente avec l'âge. Le modèle SHR est donc un modèle génétique d'hypertension analogue à l'hypertension essentielle humaine (Okamoto et Aoki 1963).

III. Stress oxydatif

Les espèces réactives oxygénées (ERO) forment une famille de molécules qui comprend l'oxygène et ses dérivés. Ces molécules sont produites par le métabolisme aérobique cellulaire et possèdent des propriétés oxydantes. L'oxydation est définie comme étant la perte d'électrons d'une substance, tandis que la réduction est définie comme un gain d'électrons par une substance. Des mécanismes de défense par des molécules antioxydantes sont mis en place afin d'éliminer ces espèces lorsqu'elles sont produites car une surproduction d'espèces réactives oxygénées est impliquée dans plusieurs maladies. Le stress oxydatif est simplement une surproduction des ERO par rapport à leur élimination. Toutefois, à de basses concentrations, ces molécules exercent des effets physiologiques.

A. Structure chimique des espèces réactives oxygénées

Plusieurs ERO possèdent un électron libre et sont connus comme étant des radicaux libres. Ces molécules sont l'anion superoxyde (O_2^-), l'anion hydroxyl (OH^-), le

monoxyde d'azote (NO) et les radicaux libres lipidiques. D'autres molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le peroxynitrite (ONOO⁻) et l'acide hypochlorique (HOCl) ne sont pas des radicaux libres, mais possèdent des propriétés oxydantes. L'anion superoxyde est l'espèce principale produite et sa production entraîne la production d'autres ERO.

B. Sources de production des espèces réactives oxygénées

Les voies de production des ERO peuvent être enzymatiques et non enzymatiques. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent activer ces voies de production. Ces facteurs incluent des facteurs vasoactifs comme l'angiotensine II et l'endothéline, le tabac et certaines conditions pathologiques comme l'hypertension, le diabète et l'insuffisance cardiaque.

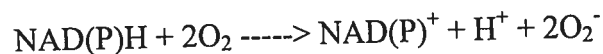
B.1 Chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est le siège du métabolisme oxydatif. Cette organelle est de forme ellipsoïdale avec un diamètre autour de 0.5 µm et une longueur de 1 µm. La mitochondrie possède une chaîne de transport d'électrons qui achemine les électrons jusqu'à l'oxygène afin de produire de l'ATP. La chaîne de transport d'électrons est formée de quatre complexes protéiques (I à IV). Les électrons sont transportés du complexe I au complexe II, du complexe II au complexe III et du complexe III au complexe IV, c'est-à-dire du complexe avec le potentiel oxydo-réducteur le plus faible jusqu'au complexe avec le potentiel oxydo-réducteur le plus élevé. O₂ est le dernier accepteur d'électrons et il se trouve dans le complexe IV. Les échanges du complexe I au III sont effectués par le

coenzyme Q tandis que l'échange du complexe III au complexe IV s'effectue par le cytochrome c (Voet et Voet 1998). Cette chaîne n'est pas parfaitement étanche et parfois des électrons s'échappent et réagissent avec le complexe semi-ubiquinone de la mitochondrie afin de former O_2^- . La mitochondrie est la plus grande source d'anion superoxyde.

B.2 NAD(P)H oxydase

La NADPH oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène (O_2) pour former l'anion superoxyde en utilisant le NADH ou le NADPH comme donneur d'électron (Griendling et al. 2000) selon la réaction suivante :



Cette enzyme est composée de 5 sous-unités dont 3 cytoplasmiques et 2 intermembranaires, qui varient de nature selon le type cellulaire. Par exemple, dans les cellules endothéliales, il y a les sous-unités gp91phox, p22phox, p47phox et p67phox (Jones et al. 1996, Bayraktutan et al. 1998). Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) expriment p22phox, p47phox et rac1, mais n'expriment pas gp91phox (Patterson et al. 1999, Ushio-Fukai et al. 1996). La NAD(P)H oxydase est activée par plusieurs facteurs comme l'angiotensine II (Griendling et al. 1994), par la thrombine (Patterson et al. 1999) ainsi que le *platelet-derived growth factor* (Sundaresan et al. 1995). Finalement, cette enzyme est la plus grande source de O_2^- dans des conditions pathologiques.

B.3 Xanthine Oxydase

La Xanthine oxydase est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine dans la voie du métabolisme des purines. Elle agit en réduisant l'état d'oxydation du NAD^+ qui par conséquent aboutit à la production de O_2^- . L'activité et l'expression de cette enzyme sont augmentées par l'interféron- γ (Dupont et al. 1992).

B.4 Nitric oxide Synthase endotheliale (eNOS)

La eNOS est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la formation du monoxyde d'azote (NO) à partir de la L-arginine. Le monoxyde d'azote possède des propriétés physiologiques importantes qui seront vues plus loin. Le bon fonctionnement de cette enzyme requiert la présence d'un cofacteur, soit le tetrahydrobiopterin (BH_4). Toutefois, lorsqu'il y a une surproduction de ERO comme O_2^- , OONO^- ou OH^\cdot , le BH_4 est oxydé en BH_3 et la eNOS est dans un état découplé. Dans cet état, la eNOS produit du O_2^- et du H_2O_2 plutôt que du NO (Cai et Harrison 2000).

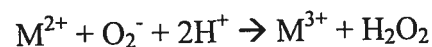
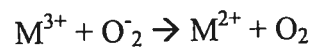
B.5 Source non enzymatique

Il existe aussi une source non enzymatique de production de ERO. En présence de métaux de transition réduits (Fe^{2+}), le H_2O_2 peut réagir avec ces métaux pour former OH^\cdot (Chance et al. 1979).

C. Voies d'élimination des espèces réactives oxygénées

C.1 Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui catalyse la conversion de l'anion superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène selon les réactions suivantes :



Où M = métal.

La SOD a été isolée de plusieurs organismes, des microorganismes jusqu'aux plantes et animaux. Il existe quatre grandes familles de SOD qui sont divisées selon le cofacteur métallique qui se trouve au site actif :

- a) Les SOD au cuivre et au zinc (Cu/Zn-SOD)
- b) Les SOD au fer (Fe-SOD)
- c) Les SOD au manganèse (Mn-SOD)
- d) Les SOD au nickel (Ni-SOD).

Toutefois, cette dernière famille n'a été retrouvée que dans *Streptomyces griseus* et *S. coelicolor* (Noor et al. 2002, Youn et al. 1996, Kim et al. 1996). Les SOD se retrouvent dans le cytoplasme, dans le milieu extracellulaire ainsi que dans la mitochondrie. La Mn-SOD se retrouve uniquement dans la mitochondrie tandis que la Cu/Zn-SOD peut être autant extracellulaire que cytosolique. Les SOD sont en général homotétramériques avec un poids moléculaire autour de 135 000 Da sauf pour la Ni-SOD qui a un poids autour de 13 000 Da (Fridovich 1997).

C.2 Molécules antioxydantes et autres enzymes

Les antioxydants sont des molécules qui, à de faibles concentrations, sont capables d'interagir avec les ERO et de les empêcher d'oxyder d'autres molécules. Notre corps est pourvu de ces molécules protectrices. Elles incluent la vitamine E, la β -carotène, la vitamine C et le glutathion. Il y a aussi des enzymes autres que la SOD qui possèdent des propriétés antioxydantes. Parmi ces enzymes, il y a la catalase et la glutathione peroxydase, deux enzymes peroxysomiales, qui transforment le H_2O_2 en H_2O . La figure 6 résume les voies de production et d'élimination des ERO. En effet, O_2^- est produit à partir de O_2 par la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la chaîne respiratoire de la mitochondrie. O_2^- est ensuite convertit en H_2O_2 par la SOD et H_2O_2 est transformé en H_2O par la catalase et la glutathione peroxydase (Dröge, 2002).

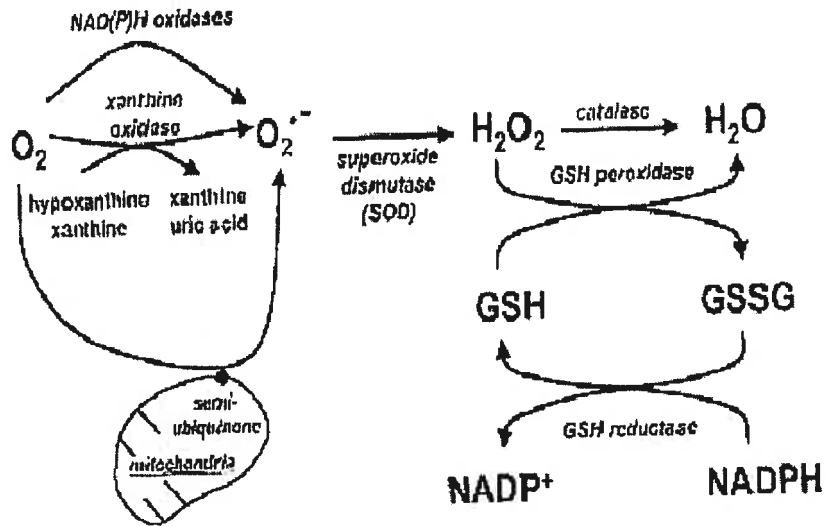


Figure 6. Voies de production et d'élimination des espèces réactives oxygénées.

Tiré de Dröge W, 2002

D. Effets physiologiques des espèces réactives oxygénées

Lorsque l'existence des ERO fut découverte, il y a 50 ans, les chercheurs croyaient que ces molécules étaient néfastes et n'avaient aucun rôle biologique. Mais quelques années plus tard, McCord et Fridovich ont réussi à convaincre plusieurs collègues qu'en effet, ces molécules sont importantes en biologie (McCord et Fridovich 1969).

D.1 Effets dans le système cardiovasculaire

Dans le système cardiovasculaire, le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde ont des rôles physiologiques importants. Le monoxyde d'azote est produit par la *nitric oxide synthase* endothéliale. Ce gaz diffuse ensuite vers les CMLV où il active la guanylate cyclase soluble pour produire un second messager, le GMPc. Le GMPc cause la relaxation des CMLV. Donc, le monoxyde d'azote est important dans le maintien du tonus vasculaire (Dröge, 2002). Le monoxyde d'azote diminue aussi l'adhésion plaquettaire sur les parois des vaisseaux contribuant ainsi à diminuer la formation de plaques lipidiques qui pourraient aboutir à une ischémie ou à l'athérosclérose (Radomski et al. 1987). L'anion superoxyde est aussi capable de médier la vasorelaxation des CMLV à une faible concentration en activant la guanylate cyclase soluble dans ces cellules (Mittal and Murad, 1977).

D.2 Effets dans le système immunitaire

Dans le système immunitaire, la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par les macrophages sert de mécanisme de défense contre les bactéries et autres microbes. En effet, des souris qui ne peuvent exprimer les sous-unités gp91phox

ou p47 de la NAD(P)H oxydase, montrent une plus faible résistance à l'infection (Dinauer et al. 1997).

D.3 Autres effets

La production des ERO joue un rôle dans l'activation des cascades de signalisation de plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les CMLV. Parmi ces voies de signalisation, il y a l'activation du récepteur de l'insuline en absence d'insuline (Fantus et al. 1989), l'activation de la voie des MAPK (Abe et al. 1996) et la voie des protéines kinases C (Gopalarishna and Anderson, 1989). L'activation de ces voies est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, le contrôle de la glycémie, l'apoptose, la prolifération et autres.

E. Effets pathologiques des espèces réactives oxygénées

En conditions physiologiques, la production et l'élimination des ERO sont des phénomènes bien contrôlés par la cellule. À de basses concentrations, les ERO ont une importance biologique. Mais parfois, des facteurs externes comme le tabac et les rayons ultra-violets ou des facteurs génétiques font en sorte que la production des ERO excède leur élimination. Ceci peut se faire soit par une suractivation des mécanismes de production ou par une diminution de la capacité antioxydante de l'organisme. Une surproduction des ERO est néfaste pour l'organisme et aboutit à des pathologies graves. Les ERO exercent leurs effets pathologiques de plusieurs façons. Un premier exemple serait l'oxydation des protéines. Comme mentionné plus haut, les protéines peuvent réagir avec des ERO. Lorsque les acides aminés sont oxydés par les ERO (oxydation de

cys en S-S, par exemple), cette modification change la conformation de certains acides aminés et pourrait par conséquent changer la fonction de la protéine. Cette modification par les ERO pourrait aussi augmenter la susceptibilité de la protéine d'être dégradée (Dröge, 2002). Les ERO ont aussi un effet similaire sur l'ADN. En modifiant la structure de l'ADN par oxydation des bases, il y a risque de changer le taux d'expression de cette molécule d'ADN qui pourrait amener à une surexpression de cet ADN et à la formation de cancers.

Le stress oxydatif contribue aussi de façon significative à la genèse de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et l'hypertension. L'athérosclérose est définie comme étant un durcissement et une augmentation de l'épaisseur de la paroi d'une artère. Le stress oxydatif, en oxydant les LDL (*low-density lipoprotéines*) induit l'expression de protéines kinases comme la *Focal adhésion kinase* et la *intercellular adhesion molecule-1* (Chien et al. 1998) qui peuvent augmenter l'adhésion des plaquettes et des leucocytes. Après avoir adhéré à la paroi de l'artère, les leucocytes peuvent pénétrer le vaisseau et se différencier en macrophages. Les macrophages formés vont, par la suite phagocyter les LDL oxydés et deviendront ainsi des plaques lipidiques. La formation de plaques lipidiques stimule la prolifération des CMLV et aboutit à la formation d'une plaque d'athérosclérose fibreuse qui peut éventuellement bloquer complètement l'artère et potentiellement causer la mort du tissu qui dépend de l'apport en nutriments par cette artère et peut mener à un infarctus (Lilly 2003).

Il y a aussi de plus en plus de groupes de chercheurs qui pensent que le stress oxydatif joue un rôle dans l'hypertension. En effet, O_2^- peut interagir avec le monoxyde d'azote pour former du $ONOO^-$. Par conséquent, il y a une diminution de la biodisponibilité du NO. Puisque le NO est un vasodilatateur puissant, il y a diminution de la vasodilatation des vaisseaux qui peut mener à l'hypertension. De plus, le O_2^- peut oxyder un cofacteur essentiel au bon fonctionnement de la eNOS, soit le BH_4 . Lorsque le BH_4 est oxydé en BH_3 , la eNOS est dans un état découplé. Dans cet état, la eNOS produit du O_2^- et du H_2O_2 plutôt que du NO (Cai et Harrison 2000). Toutefois, il n'est pas connu encore si le stress oxydatif est une cause ou une conséquence de l'hypertension.

IV. Altérations du système Adénylate cyclase/AMPC dans l'hypertension

Des altérations dans le fonctionnement du système adénylate cyclase/AMPC sont impliquées dans diverses conditions pathologiques comme l'hypertension (Triner et al. 1972), l'insuffisance cardiaque (Feldman et al. 1989) et le diabète (Lynch et al. 1989).

L'élévation de la pression artérielle dans l'hypertension essentielle est due à une augmentation de la résistance périphérique des vaisseaux. Des changements structuraux des vaisseaux, des mouvements des ions Ca^{2+} anormaux et des changements dans le métabolisme des nucléotides cycliques (AMPC) sont des mécanismes responsables de cette augmentation de la résistance périphérique. Il a été suggéré que le système adénylate cyclase/AMPC est un mécanisme biochimique qui participe à la régulation du tonus vasculaire (Triner et al. 1972). Une diminution des niveaux d'AMPC dans les tissus cardiovasculaires est impliquée dans la pathogenèse de l'hypertension. Des études

différentes ont rapporté qu'il y avait une augmentation (Triner et al. 1972), une diminution (Ramanathan et Shubata 1974) ou aucun changement (Amer 1973) de l'activité de l'adénylate cyclase dans les SHR. Une diminution de la stimulation par des agonistes comme l'isoprotérénol, l'adénosine, l'épinéphrine, le glucagon, NAF et la dopamine a été rapportée dans les cœurs (Anand-Srivastava 1988) et aortes (Anand-Srivastava 1992) de rats SHR, les rats hypertendus au sel du déoxycorticostérone (DOCA-salt, Anand-Srivastava et al. 1993) ainsi que le modèle d'hypertension *one kidney-one clip* (1K-1C, Ge et al. 1999), c'est-à-dire 1 seul rein dont la circulation dans l'artère rénale est diminué par une épingle, comparé aux rats contrôles. Par contre, une augmentation de la stimulation de l'adénylate cyclase par l'isoprotérénol a été observée dans les plaquettes des SHR comparé aux rats contrôles Wistar-Kyoto (WKY, Anand-Srivastava 1993). De plus, une plus grande inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase par l'oxotremorine, le PNA et l'Ang II a été observée dans les cœurs et aortes des SHR, des rats DOCA-sel et les rats 1K-1C comparés aux rats contrôles respectifs (Anand-Srivastava 1992, Anand-Srivastava 1993, Ge et al. 1999). La variation des réponses de l'adénylate cyclase à ces hormones est due à un changement du nombre de récepteurs ou de l'affinité de l'enzyme pour le récepteur (Limas et Limas 1978), à des changements des niveaux des protéines G et à un couplage défectueux entre la protéine G et la sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase (Anand-Srivastava 1988).

Une augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ ainsi que de leur ARNm a été observé dans les cœurs et aortes des SHR comparé aux rats WKY, tandis que les niveaux de $G_{s\alpha}$ ne changent pas (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992).

L'augmentation des protéines $G\alpha$ précède l'apparition de l'hypertension chez les SHR (Marcil et al. 1997). Des études montrent que le traitement des SHR avec du captopril, un inhibiteur de l'ECA, réduit non seulement la pression artérielle, mais aussi l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 vers les niveaux observés pour les rats WKY. Ces études suggèrent que l'Ang II joue un rôle dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans l'hypertension (Pandey et al. 1996). Des résultats similaires ont été obtenus chez le modèle d'hypertension 1K-1C (Ge et al. 1999). De plus, le traitement des cellules A10 avec de l'Ang II a augmenté l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 laquelle a été restaurée vers les niveaux témoins par le losartan, un antagoniste du récepteur AT1 (Anand-Srivastava et Palaparti 2003). L'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 médiée par l'Ang II a été atténuée par un inhibiteur de MAPK suggérant un rôle de la voie des MAPK dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 médiée par l'Ang II (Ge and Anand-Srivastava 1998). Il est connu que le stress oxydatif est augmenté dans les SHR (Wu et al. 2001), que l'Ang II augmente le stress oxydatif en activant la NAD(P)H oxydase (Griendling et al. 1994) et que les niveaux d'Ang II sont augmentés dans l'hypertension (Jennemaitre et al. 1992). Il est donc possible que le stress oxydatif joue un rôle dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans l'hypertension. De plus, la voie des MAPK est impliquée dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 induite par l'Ang II (Ge et Anand-Srivastava 1998) et il est connu que les ERO activent la voie des MAPK et que l'Ang II active la voie des MAPK. Donc, il est possible que le stress oxydatif soit impliqué dans l'augmentation de protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 en activant la voie des MAPK.

Mais comment une baisse des niveaux de l'AMPc peut-elle mener à une augmentation de la contraction du muscle lisse? La contraction du muscle lisse est assurée par la chaîne légère de la myosine lorsque celle-ci se trouve dans un état phosphorylé. La chaîne légère de la myosine est phosphorylée par la kinase des chaînes légères de la myosine. Cette kinase se retrouve sous deux formes, active et inactive. Lorsque la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) est phosphorylée, elle se retrouve dans un état inactif, donc incapable de phosphoryler à son tour la chaîne légère de la myosine afin d'amorcer la contraction du muscle lisse. La MLCK est phosphorylée par la protéine kinase A qui elle, est activée par l'AMPc produit par l'adénylate cyclase (Voet et Voet 1998). Une augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ mène à une augmentation de l'inhibition de l'adénylate cyclase, une diminution de la production de l'AMPc, une diminution de l'activation de la protéine kinase A, une diminution de la phosphorylation de la MLCK, une augmentation de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine et augmentation de la contraction.

V. Objectifs

Le but de cette étude est d'examiner le rôle du stress oxydatif dans l'augmentation de l'expression des protéines $\text{Gi}\alpha\text{-2}$ et $\text{Gi}\alpha\text{-3}$ dans les SHR, un modèle d'hypertension, comparé aux rats témoins WKY. De plus, il s'agit de vérifier si la voie des MAPK est impliquée dans l'augmentation de l'expression des protéines $\text{Gi}\alpha\text{-2}$ et $\text{Gi}\alpha\text{-3}$ et si les ERO sont responsables de l'activation de la voie des MAPK. Des CMLV de l'aorte de rats SHR et WKY de 12 semaines ont été utilisées. L'effet des antioxydants N-acétylcystéine et diphénylèneiodonium sur l'expression des protéines $\text{Gi}\alpha\text{-2}$ et $\text{Gi}\alpha\text{-3}$ a été vérifiée par immunobuvardage et l'effet de ces antioxydants sur l'activité de l'adénylate cyclase sera aussi vérifié. De plus, l'effet d'un inhibiteur de la voie des MAPK (PD98059) sur l'expression des protéines $\text{Gi}\alpha\text{-2}$ et $\text{Gi}\alpha\text{-3}$ a été aussi examiné. Finalement, l'effet des antioxydants sur l'activation de la voie des MAPK a été vérifié par immunobuvardage en mesurant les niveaux de ERK 1/2 phosphorylées. Les antioxydants utilisés, NAC et DPI, ont des mécanismes d'action différents. Le NAC est simplement un « scavenger » de radicaux libres, tandis que le DPI est un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase. Ces deux antioxydants ont été utilisés afin d'attaquer plusieurs cibles responsables de la production d'ERO.

Chapitre 2

*Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gia proteins and
adenylyl cyclase signalling in vascular smooth muscle cells from spontaneously
hypertensive rats*

Georgios Lappas, Grace Bou Daou and Madhu B. Anand-Srivastava **


Department of Physiology and Groupe de recherche sur le système nerveux autonome (GRSNA),

University of Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada

Soumis à Circulation Research

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava
Department of Physiology
Faculty of Medicine
University of Montreal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montreal, Quebec, Canada
H3C 3J7
Tel : (514) 343-2091
Fax : (514) 343-2111



Abstract

We have previously shown an enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in spontaneously hypertensive rats (SHR) that precedes the development of hypertension. Since oxidative stress has been shown to be increased in SHR, the present studies were undertaken to examine the role of oxidative stress in enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in SHR. Vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and their age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY) were used for the present studies. VSMC from SHR exhibited enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins as compared to age-matched WKY, however, the levels of $G_{s\alpha}$ were not different between the two groups. Treatment of VSMC with antioxidants such as N-acetyl-L-cysteine (NAC) or diphenyleneiodonium (DPI) for 24 hours decreased the enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in a concentration-dependant manner in VSMC from SHR as determined by immunoblotting. In addition, the enhanced receptor-dependant and -independent functions of $G_{i\alpha}$ proteins and diminished functions of $G_{s\alpha}$ proteins in SHR were restored to WKY levels by NAC and DPI treatments. Furthermore, PD98059, a selective inhibitor of MAP kinase was able to restore the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in VSMC from SHR towards WKY levels. In addition, the enhanced activity of ERK1/2 in SHR as compared to WKY as demonstrated by enhanced phosphorylation of ERK1/2, was also restored to WKY levels by NAC or DPI. These results suggest that enhanced levels of $G_{i\alpha}$ and associated functions in SHR may be attributed to the enhanced oxidative stress present in SHR which exerts its effects through the MAPK signalling pathway.

Key words:

Adenylyl cyclase, G proteins, oxidative stress, MAPK, vascular smooth muscle cells, spontaneously hypertensive rats.

Introduction

Guanine nucleotide regulatory proteins (G proteins) are a family of GTP-binding proteins that play an important role in the regulation of a variety of signal transduction systems, including the adenylyl cyclase/cAMP system. Adenylyl cyclase system is composed of three components: receptor, catalytic subunit, stimulatory (Gs) and inhibitory (Gi) guanine nucleotide regulatory proteins (1,2). The stimulation and inhibition of adenylyl cyclase by hormones are mediated by these two distinct G proteins (Gs and Gi), which couple the receptor to the catalytic subunit. G proteins are heterotrimeric and are composed of α , β and γ subunits. The α subunit is responsible for binding and hydrolyzing GTP and confers specificity in receptor and effector interaction. Molecular cloning has revealed four different forms of Gs α resulting from the differential splicing of a single gene (3,4) and three distinct forms of Gi α (Gi α -1, Gi α -2, Gi α -3) encoded by three distinct genes (5). All three forms of Gi α are implicated in adenylyl cyclase inhibition (5) and in activation of atrial K⁺ channels (6).

Gi protein and associated adenylyl cyclase signalling has been shown to be implicated in a variety of cellular functions such as vascular permeability (7), salt and water transport (8) and catecholamine release (9), all of which play an important role in the regulation of blood pressure. Alterations of the levels of Gi proteins that result in the impaired cellular functions lead to various pathological states such as hypertension. These abnormalities have been reported in cardiovascular tissues from genetic models (spontaneously hypertensive rats) and different models of experimentally induced hypertensive rats (10-12). An increased expression of Gi proteins and Gi protein mRNA in hearts and aortas from SHR and in hearts from deoxycorticosterone acetate (DOCA)-

salt hypertensive rats with established hypertension has been reported (10-12). On the other hand, the levels of G_{α} were shown to be unaltered in SHR (10,12). The increased expression of G_{α} proteins precedes the development of hypertension in SHR (13). It has also been reported that pertussis toxin treatment of prehypertensive rats attenuates the development of high blood pressure in SHR by inactivating Gi proteins (14), suggesting that the enhanced levels of Gi proteins that result in the decreased levels of cAMP and associated cellular functions may be the contributing factors in the pathogenesis of hypertension.

The levels of various vasoactive peptides including angiotensin II (AngII) that have been shown to be enhanced in hypertension may be responsible for the enhanced expression of G_{α} proteins. This was supported by studies showing that treatment of SHR with captopril, an antihypertensive drug that acts by blocking the angiotensin I converting enzyme, decreased blood pressure and enhanced Gi protein levels (15). Furthermore, AngII has been shown to increase the levels of Gi proteins in A10 smooth muscle cells (16), which was attenuated by losartan and a MEK inhibitor (17,18). AngII also increases oxidative stress by activating NADPH oxidase (19). An increased oxidative stress has also been reported in SHR (20) and other cardiovascular diseases such as diabetes and atherosclerosis (21,22). Taken together, it may be possible that increased oxidative stress in SHR, through activation of MAPK activity, may be a contributing factor in enhanced expression of Gi proteins and thereby hypertension. To examine this possibility, the present studies were undertaken to determine the effect of antioxidant treatment on MAPK activity, Gi protein expression and adenylyl cyclase signalling in vascular smooth muscle cells from SHR and their age-matched control WKY rats.

Materials and methods

Materials

3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) was purchased from Aldrich Chemical Corporation (Milwaukee, WI). N-acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from BDH inc. (Toronto, Ontario, Canada). [α - 32 P]ATP was purchased from Amersham Corp. (Oakville, Ontario, Canada). Antibodies AS/7, EC/2, RM/1 and monoclonal phospho-specific-Tyr²⁰⁴-ERK1/2 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Myokinase (EC 2.7.4.3) and all other chemicals used in these experiments were purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO).

Methods

Cell culture and incubation. Vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12-weeks old SHR and their age-matched WKY were cultured from aortas as described previously (23) and were plated in 75 cm² flasks and incubated at 37 °C in 95% air and 5% CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine, pyridoxine hydrochloride and 110 mg/L sodium pyruvate) containing antibiotics and 10% heat-inactivated bovine serum (FBS). The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin containing 0.2% EDTA and utilized between passages 4 and 12. Confluent cell cultures were starved by incubation for 3 hours in DMEM without FBS at 37°C. These cells were then incubated in the absence or presence of NAC (20 mmol/L), DPI (10 μ mol/L) or PD98059 (10 μ mol/L) for 24 hours. The cells after washing with ice-cold homogenizing buffer (TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5)) were scraped in ice-cold homogenizing buffer with a rubber policeman and collected in a homogenizing tube. Cells were homogenized with a potter

(10 strokes) and membranes were collected by centrifugation at 4 °C for 10 minutes at 2800 RPM and resuspended in buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl and 1 mmol/L EDTA, pH 7.5. Homogenates were used for immunoblotting and adenylyl cyclase assay. For MAPK studies, cells were grown to confluence in 60 mm plates and incubated in serum-free DMEM for 20 hours and then treated with NAC or DPI for 6 hours. These cells were then washed twice with ice-cold phosphate-buffer saline (PBS) and lysed in 200 µl of buffer (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Na orthovanadate, 10 mmol/L Na fluoride, 10 mmol/L Na pyrophosphate, 2 mmol/L benzamidine, 2 mmol/L ethylenebis(oxyethylenenitrolo)-tetraacetic acid, 2 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.5 µg/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were centrifuged at 12 000 g for 10 minutes at 4 °C. Supernatants were used for immunoblotting using monoclonal phospho-specific-Tyr²⁰⁴-ERK1/2.

Adenylyl cyclase activity determination. Adenylyl cyclase activity was determined by measuring [³²P]cAMP formation from [α -³²P]ATP, as described previously (10,11). Briefly, the assay medium contained 50 mmol/L glycylglycine, pH 7.5, 0.5 mmol/L MgATP, [α -³²P]ATP (1.5×10^6 cpm), 5 mmol/L MgCl₂ (in excess of ATP concentration), 100 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L cAMP, 1mmol/L IBMX, 2 mmol/L phosphocreatine (CRP), 0.1 mmol/L EGTA, 10 µmol/L guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP γ S) and an adenosine triphosphate (ATP)-regenerating system consisting of 0.1 mg creatine phosphokinase/ml and 0.1 mg of myokinase/ml in a final volume of 200 µL. Incubations were initiated by the addition of the crude membrane

preparations (20-30 μg) to the reaction mixture, which had been thermally equilibrated for 2 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$. The reactions conducted in triplicate for 10 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$ were terminated by the addition of 0.6 ml of 120 mmol/L zinc acetate. cAMP was purified by coprecipitation of other nucleotides with ZnCO_3 by addition of 0.5 ml of 144 mmol/L Na_2CO_3 and subsequent chromatography by the double column system as previously described (24). Under the assay conditions used, adenylyl cyclase activity was linear with respect to protein concentrations and time of incubation. Protein concentration was determined as described by Lowry et al. (25) with bovine serum albumin as standard.

Immunoblotting. Immunoblotting of G proteins was performed as described previously (11). After SDS-PAGE, the separated proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose paper (Sigma) with a semidry transblot apparatus (Bio-Rad) at 15 V for 45 minutes. After transfer, the membranes were washed with PBS and were incubated in PBS containing 5% dehydrated milk and 0.2% Tween 20. The following day, the blots were washed in PBS containing 0.2% Tween 20 for 10 minutes and were then incubated with antibody AS/7 (Santa Cruz) against $\text{G}\alpha\text{-2}$ (mouse) and antibody EC/2 against $\text{G}\alpha\text{-3}$ proteins or monoclonal phospho-specific-Tyr²⁰⁴-ERK1/2 in PBS containing 5% dehydrated milk and 0.2% Tween 20 at room temperature for 90 minutes. The blots were washed three times with PBS containing 0.2% Tween 20. The antibody-antigen complexes were detected by incubating the blots with goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) or with goat anti-mouse (Santa Cruz) conjugated with horseradish peroxidase for 60 minutes at room temperature. The blots were washed three times with PBS containing 0.2% Tween 20 before reaction with enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagents from Santa Cruz. Quantitative analysis of specific bands was

performed by densitometric scanning of the films employing the enhanced laser densitometer (LKB Ultrosan XL) and quantified using the gel scan evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Quebec, Canada).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons between groups were made with ANOVA in conjunction with the Newman-Keuls test. Results were considered significant at a value of $P < 0.05$.

Results

G α protein levels

We have previously shown an increased expression of G α -2 and G α -3 proteins in hearts and aortas of SHR compared to WKY while the levels of G α were unchanged (10, 12). To investigate if VSMC from aorta from SHR also exhibited enhanced expression of G α proteins as compared to WKY rats, the levels of G α proteins were determined by immunoblotting techniques using specific antibodies against G α proteins. As shown in figure 1, antibody AS/7 detected a single protein of 40 kDa corresponding to G α -2 and antibody EC/2 detected a single protein of 41 kDa corresponding to G α -3 in VSMC from both SHR and WKY rats. However, the levels of immunodetectable G α -2 and G α -3 in VSMC from SHR were significantly enhanced by about 30% compared to VSMC from WKY as determined by densitometric scanning. On the other hand, antibody RM/1 against G α recognized three bands at 45, 47 and 52 kDa corresponding to three different isoforms of α subunits of Gs in both VSMC from SHR and WKY rats, however, no significant difference in the levels of G α were observed between the two groups.

Effect of antioxidants on G α protein Expression

In order to investigate if the enhanced expression of G α proteins in VSMC from SHR is attributed to increased oxidative stress, the effect of antioxidant treatment on G α protein expression was examined. As shown in figure 2, the expression of G α -2 and G α -3 proteins which was enhanced by about 30% in VSMC from SHR was restored to control WKY levels by NAC and DPI. At 5 mM, NAC restored the enhanced expression of G α -2 by about 50% whereas a complete restoration was observed at 20 mmol/L NAC. On the other hand, the enhanced expression of G α -3 was restored to WKY levels at 5

mmol/L NAC. Similarly, DPI also restored the enhanced expression of $G\alpha$ -2 and $G\alpha$ -3 towards control WKY levels in a concentration-dependant manner (figure 3). The complete restoration of enhanced expression of $G\alpha$ -2 and $G\alpha$ -3 proteins to control levels was obtained at 10 μ mol/L and 5 μ mol/L DPI respectively. However NAC and DPI did not have any effect on the $G\alpha$ levels in VSMC from WKY rats.

Effect of antioxidants on receptor-independent functions

To examine if the enhanced levels of $G\alpha$ -2 and $G\alpha$ -3 proteins observed in VSMC from SHR was also reflected in enhanced Gi functions, receptor-independent and-dependant functions of $G\alpha$ proteins were investigated. The receptor-independent functions of Gi were investigated by studying the effect of GTP γ S on forskolin (FSK)-stimulated adenylyl cyclase activity. The results shown in figure 4 indicate that GTP γ S inhibited forskolin-stimulated activity in a concentration-dependant manner in VSMC from WKY and SHR. However, as reported earlier (10,14), the inhibition was significantly greater in VSMC from SHR compared to VSMC from WKY rats. The treatment of the cells with NAC (20 mmol/L) or DPI (10 μ mol/L) reversed the enhanced inhibition of FSK-stimulated adenylyl cyclase activity by GTP γ S to WKY levels. However, NAC or DPI were without effect on GTP γ S-mediated inhibition of forskolin-stimulated activity in VSMC from WKY rats.

Effect of antioxidants on receptor-dependent functions

The receptor-dependant functions were studied by examining the hormonal inhibitions of adenylyl cyclase activity. Figure 5 shows the effect of antioxidants on AngII-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in VSMC from SHR and WKY rats. AngII that inhibits adenylyl cyclase activity through $G\alpha$ regulatory protein inhibited

adenylyl cyclase activity in VSMC from both SHR and WKY rats. However, the extent of inhibition was greater in SHR as compared to WKY rats (40% vs 25%) and this enhanced inhibition was restored to WKY levels by NAC and DPI. Similarly, C-ANP₄₋₂₃ that interacts specifically with ANP-C receptor, inhibited adenylyl cyclase activity in a concentration-dependant manner in VSMC from WKY and SHR, however, as reported earlier (14), the inhibition was greater in SHR as compared to WKY rats. For example, C-ANP₄₋₂₃ at 10^{-6} mol/L inhibited adenylyl cyclase by about 45% in SHR and 25% in WKY. The enhanced inhibition of adenylyl cyclase activity by C-ANP₄₋₂₃ was restored towards control levels by NAC (figure 6A) and DPI (figure 6B), whereas NAC and DPI were without effect on the hormonal-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in WKY rats.

Effect of antioxidants on GTP γ S-mediated stimulation of adenylyl cyclase activity

The effect of GTP γ S on adenylyl cyclase activity was also investigated in this study. GTP γ S stimulated adenylyl cyclase activity in a concentration-dependant manner in both groups, however, as reported earlier (10,14), the extent of stimulation was significantly decreased in VSMC from SHR as compared to VSMC from WKY rats. At 10^{-5} mol/L, GTP γ S augmented the adenylyl cyclase activity by about 40-fold in VSMC from WKY rats compared to 25-fold in VSMC from SHR. However, the treatment of cells from SHR with NAC or DPI resulted in the restoration of decreased stimulation of adenylyl cyclase to control WKY levels, whereas these treatments had no effect on GTP γ S-mediated stimulation of adenylyl cyclase activity in VSMC from WKY rats (figure 7).

Effect of antioxidants on hormonal stimulation of adenylyl cyclase activity

We have previously shown a role of enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in modulating Gs-mediated functions in hearts and aorta from SHR and other models of experimentally-induced hypertensive rats (10, 11, 14). To investigate if the increased expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in VSMC from SHR can also modulate Gs-mediated functions in VSMC from SHR, the effect of isoproterenol on adenylyl cyclase activity was examined. As shown in figure 8A, isoproterenol (50 $\mu\text{mol/L}$) stimulated adenylyl cyclase activity in VSMC from both SHR and WKY rats. However, the extent of stimulation was significantly decreased in VSMC from SHR as compared to WKY rats (1700% vs 750%). NAC or DPI treatment restored the decreased stimulation of adenylyl cyclase activity in VSMC from SHR to WKY levels. In addition, sodium fluoride (NaF) that stimulates the enzyme activity by receptor-independent mechanism also stimulated adenylyl cyclase activity in VSMC from both SHR and WKY rats. The extent of stimulation was however significantly decreased by 50% in VSMC from SHR and NAC or DPI were able to restore the decreased stimulation towards WKY levels (figure 8B).

Implication of MAPK pathway on enhanced expression of Gi protein expression in SHR

We have previously shown the involvement of the MAPK pathway in Ang II-mediated enhanced expression of Gi proteins in A10 VSMC (17). Since the levels of Ang II have been shown to be increased in SHR (15), it was of interest to investigate if MAPK is implicated in enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in SHR. Figure 9 shows the effect of PD98059, a selective inhibitor of MEK, on the enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins in VSMC from SHR. The levels of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ as shown before, were

increased in SHR and PD98059 at 10 $\mu\text{mol/L}$, restored the increased expression of $\text{G}\alpha\text{-2}$ and $\text{G}\alpha\text{-3}$ proteins to control WKY levels.

Effect of antioxidants on MAPK activity

To investigate if MAPK activity was also increased in SHR, the levels of phospho-ERK1/2 were detected by using specific antibodies. As shown in figure 10, phospho-specific-Tyr²⁰⁴-ERK1/2 antibody detected two proteins at 42 and 44 kDa corresponding to ERK1/2 in VSMC from both SHR and WKY rats. The extent of ERK 1/2 phosphorylation was however increased by about 190% in VSMC from SHR compared to WKY which was restored to control WKY levels by NAC and DPI suggesting that the enhanced expression of $\text{G}\alpha\text{-2}$ and $\text{G}\alpha\text{-3}$ proteins in SHR is due to increased activation of the MAPK signalling pathway.

Discussion

We and others have previously shown an enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in hearts and aorta from SHR (10,12) and experimentally induced hypertensive rat (HR) models, including DOCA-salt and one kidney-one clip (1K1C) HR (11,23). The enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins occurs before the onset of hypertension (13,26) and suggests that the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins may be one of the contributing factors in the pathogenesis of hypertension. This was further confirmed by our recent studies showing that inactivation of enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins, by intraperitoneal injection of pertussis toxin into 2-week-old prehypertensive SHR, attenuated the development of high blood pressure in SHR (14), and suggesting that the enhanced levels of G_i proteins that result in the decreased levels of cAMP and impaired cellular functions may be the contributing factor in the pathogenesis of hypertension (14).

In the present studies, we report that VSMC from SHR also exhibited enhanced expression of $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ proteins as compared to control WKY rats and the fact that antioxidant treatment restored the enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins to control WKY levels suggests the implication of oxidative stress in enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in SHR.

We have also previously shown that captopril treatment of SHR as well as 1K1C hypertensive rats that also exhibited enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins, attenuated the development of high blood pressure and enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins toward control levels (15,23) suggesting the implication of AngII in augmented levels of $G_{i\alpha}$ proteins, which have been shown to be responsible for the pathogenesis of hypertension (15,23). Furthermore, AngII has been shown to increase the levels of $G_{i\alpha}$ proteins in A10 VSMC

which was restored to control levels by losartan treatment (16,18). In addition, we have also shown that AngII-induced increased expression of $G_{i\alpha}$ proteins in VSMC was attenuated by antioxidant treatment (unpublished data, 2004) which suggests the implication of oxidative stress in AngII-induced enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins. In this regard, Ang II has also been reported to increase oxidative stress in VSMC (27). Taken together, it may be possible that the enhanced oxidative stress observed in VSMC from SHR may be attributed to the enhanced levels of AngII. This notion is further substantiated by our recent studies showing that enhanced production of superoxide anion in VSMC from SHR was attenuated by losartan treatment (unpublished data, 2004).

The enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins in VSMC from SHR as compared to WKY rats was also reflected in enhanced G_i functions, as demonstrated by increased inhibition of FSK-stimulated adenylyl cyclase activity by low concentrations of $GTP\gamma S$ and enhanced inhibition by AngII and C-ANP₄₋₂₃. Antioxidants NAC or DPI that result in the restoration of enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins to control levels also restored the C-ANP₄₋₂₃ and AngII-mediated enhanced inhibition of adenylyl cyclase activity and enhanced inhibition of FSK-stimulated adenylyl cyclase activity by $GTP\gamma S$. Our results are in accordance with the previous studies showing that captopril or losartan treatment of 1K-1C or L-NAME hypertensive rats that restored the enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins also restored the enhanced G_i functions to control levels (23, 28). Furthermore, pertussis toxin treatment of SHR, which inactivated and decreased the enhanced levels of $G_{i\alpha}$ proteins has been shown to decrease G_i functions and therefore increased formation of cAMP, which contributes to the attenuation of hypertension.

The decreased stimulation of adenylyl cyclase by GTP γ S in VSMC from SHR as compared to WKY is in agreement with the studies reported earlier in SHR and other models of hypertensive rats (11-14) and may not be attributed to Gs α protein, because the levels of Gs α were not altered in SHR. As the $\beta\gamma$ subunit has been reported to inhibit adenylyl cyclase directly or indirectly through the inactivation of Gs α -GTP (29), a role of the $\beta\gamma$ subunit in eliciting the diminished stimulation of adenylyl cyclase in GTP γ S cannot be ignored. On the other hand, the increased levels of Gi α protein in SHR may contribute to the attenuated stimulation of adenylyl cyclase by GTP γ S. This is further substantiated by our studies showing that restoration of the enhanced levels of Gi α proteins to control WKY levels by antioxidant treatments also restored the GTP γ S-mediated diminished stimulation of adenylyl cyclase to WKY levels.

We have previously reported the decreased stimulation of adenylyl cyclase by stimulatory hormones, in hearts and aorta from SHR and other models of hypertensive rats (10,14). In the present studies, we have shown that VSMC from aorta from SHR also exhibited diminished stimulation of adenylyl cyclase by isoproterenol and NaF as compared to control WKY rats which was restored to control levels by antioxidants treatment. The attenuated stimulation of adenylyl cyclase by isoproterenol in SHR may be attributed to the downregulation of β -adrenergic receptor (30), defective coupling and/or an impaired catalytic subunit of adenylyl cyclase system (31). Since no alterations in the levels of Gs α proteins were observed in VSMC from SHR, the decreased stimulation of adenylyl cycles by isoproterenol cannot be explained by Gs α . The fact that antioxidants treatment that restored the enhanced levels of Gi α proteins to control levels restored the ability of isoproterenol and NaF to adenylyl cyclase activity towards control

levels suggests the implication of $G_{i\alpha}$ protein in attenuated stimulation of adenylyl cyclase by isoproterenol and NaF in SHR. In this regard, the modulation of $G_{s\alpha}$ functions by $G_{i\alpha}$ has been reported by various investigators (29).

We have previously shown a role of MAPkinase pathway in Ang II-induced enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in A10 VSMC (17). In the present studies, we also report that the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins observed in VSMC from SHR may also be attributed to increased activity of MAPK, because PD98059, an inhibitor of MAPK attenuated the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in SHR to control WKY levels. In addition, we have also shown that VSMC from SHR also exhibited increased activity of ERK1/2 as compared to VSMC from WKY rats. Our results are in accordance with the studies of Kubo et al., who have also reported an increased activity of MAPK in VSMC from aorta from 9-week-old SHR (32). In addition, aorta from SHR and DOCA-salt hypertensive rats, stroke prone SHR and Ang II-infused hypertensive rats have also been shown to express enhanced activity of MAPK as compared to their respective control rats (33-35). Taken together, it may be suggested that enhanced MAPK activity may be responsible for the enhanced expression of $G_{i\alpha}$ proteins in VSMC from SHR. We have also reported that enhanced activity of MAPK in SHR was restored to control WKY levels by antioxidants such as DPI and NAC, suggesting a role of oxidative stress in enhanced activation of MAPK in SHR. In this regard, the increased oxidative stress as demonstrated by enhanced production of superoxide anion has also been shown in VSMC from SHR (unpublished observation).

The generation of reactive oxygen species (ROS) that increases oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of many vascular diseases such as hypertension,

diabetes, atherosclerosis and vascular remodelling by several investigators (22,36,37). The treatment of hypertensive rats with antioxidants has been shown to decrease the blood pressure (38). Wu et al. have shown that treatment of SHR with aspirin (100 g/kg/day) for 12 days decreased blood pressure and superoxide anion production (39). However, the mechanism by which antioxidants decreased blood pressure has not been fully understood.

In conclusion, we have provided the first evidence that enhanced oxidative stress due to either enhanced levels of Ang II or other factors increase MAPkinase activity which results in the enhanced levels of Gi proteins and that by decreasing the levels of cAMP and associated impaired cellular functions may be the contributing factor in the pathogenesis of hypertension (Fig. 11). Thus, it may be suggested that antioxidant treatment by decreasing oxidative stress and thereby MAPkinase activity results in the attenuation of enhanced levels of Gi proteins and increased levels of cAMP which by decreasing vascular resistance may contribute to the attenuation of blood pressure in SHR.

References

1. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995; **80**: 249-257.
2. Rodbell M, Krans HM, Phil SL, Birnbaumer L. The glucagons-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding ^{125}I -glucagon. *J Biol Chem*. 1971; **246**: 1872-1876.
3. Bray P, Carter A, Simons C, Guo V, Puckett C, Kamholz J, Spiegel A, Nirenburg M. Human cDNA clones for four species of G α signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; **83**:8893-8897.
4. Robishaw JD, Smigel MD, Gilman AG. Molecular basis for two forms of the G protein that stimulates adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1986; **261**: 9587-9590.
5. Itoh H, Toyama R, Kozasa T, Tsukamoto T, Matsuoka M, Kaziro Y. Presence of three distinct molecular species of G α protein α subunit: structure of rat cDNAs and human genomic DNAs. *J Biol Chem*. 1988; **263**: 6656-6664.
6. Yatani A, Mattera R, Codina J, Graf R, Okabe K, Padrell E, Iyengar R, Brown AM, Birnbaumer L. The G protein-gated atrial K $^{+}$ channel is stimulated by three distinct G α -subunits. *Nature*, 1988; **336**: 680-682.
7. Noll T, Hempel A, Piper NM. Neuropeptide Y reduces macromolecule permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol*. 1996; **271**: H1878-H1883.
8. Ferraille E, Doucet A. Sodium-potassium adenosine triphosphatase-dependant sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev*. 2001; **81**: 345-418.
9. Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Goldstein M, Masuyama Y. Modulation of [^3H]dopamine release by neuropeptide Y in rat striatal slices. *Eur J Pharmacol*. 1997; **321**: 5-11.

10. Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats: relationship to adenylyl cyclase inhibition. *Biochem J.* 1992; **288**: 79-85.
11. Anand-Srivastava MB, de Champlain J, Thibault C. DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am J Hypertens.* 1993; **6**: 72-75.
12. Thibault C, Anand-Srivastava MB. Altered expression of G-protein mRNA in spontaneously hypertensive rats. *FEBS Lett.* 1992; **313**: 160-164.
13. Marcil J, Thibault C, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi-proteins precedes the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; **29**: 1009-1022.
14. Li Y, Anand-Srivastava MB. Inactivation of enhanced expression of Gi proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 2002; **91**: 247-254.
15. Pandey SK, Anand-Srivastava MB. Modulation of G-protein expression by the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril in hearts from spontaneously hypertensive rats: Relationship to adenylyl cyclase. *Am J Hyper.* 1996; **9**: 833-837.
16. Palaparti A, Ge C, Anand-Srivastava MB. Angiotensin II enhances the expression of Gi α in A10 cells (smooth muscle): Relationship with adenylyl cyclase activity. *Arch Biochem Biophys.* 1999; **365**: 113-122.
17. Ge C, Anand-Srivastava MB. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in AII-mediated enhanced expression of Gi proteins in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 1998; **251**: 570-575.

18. Anand-Srivastava MB, Palaparti A. Angiotensin-II-induced enhanced expression of Gi proteins is attenuated by losartan in A10 vascular smooth muscle cells: role of AT1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; **81**: 150-158.
19. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; **74**: 1141-1148.
20. Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hyper.* 2001; **19** : 741-748.
21. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. *Circ Res.* 2000; **87**: 840-844.
22. Baynes JW. Role of oxidative stress in development in diabetes. *Diabetes.* 1991; **40**: 405-412.
23. Ge C, Garcia R, Anand-Srivastava MB. Altered expression of Gi-protein and adenylyl cyclase activity in hearts from one kidney-one clip hypertensive rats: effect of captopril. *J Hypertens.* 1999; **17** : 1617-1626.
24. Salomon Y, Londos C, Rodbell M. A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal biochem.* 1974; **58**: 541-548.
25. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**: 265-275.

26. Marcil J, de Champlain J, Anand-Srivastava MB. Overexpression of Gi-proteins precedes the development of DOCA-salt-induced hypertension: relationship with adenylyl cyclase. *Cardiovasc. Res.* 1998; **39**: 1617-1626.
27. Laplante MA, Wu R, El Midaoui, de Champlain J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependant on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 2003; **21**: 927-936.
28. Hashim S, Anand-Srivastava MB. Losartan-induced attenuation of blood pressure in L-NAME hypertensive rats is associated with reversal of the enhanced expression of Gi α proteins. *J Hypertens.* 2004; **22**: 181-190.
29. Cerione RA, Staniszewski C, Caron MG, Lefkowitz RJ, Codina J, Birnbaumer J. A role for Ni in the hormonal stimulation of adenylate cyclase. *Nature.* 1985; **318**: 293-295.
30. Limas C, Limas CJ. Reduced number of b-adrenergic receptors in the myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978; **83**: 710-714.
31. Anand-Srivastava MB. Altered responsiveness of adenylate cyclase to adenosine and other agents in the myocardial sarcolemma and aorta of spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 1988; **37**: 3017-3022.
32. Kubo T, Ibuski T, Chuba S, Kambe T, Fukumosi R. Altered mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Expt Pharmacol Physiol.* 2002; **29**: 537-543.
33. Kubo T, Ibuski T, Saito E, Kambe T, Hagiwara Y. Different activation of vascular mitogen-activated protein kinases in spontaneously and DOCA-salt hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2001; **400**: 231-237.

34. Yano M, Kim S, Izumi Y, Yamanaka S, Iwao K. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ Res.* 1998; **83**: 752-760.
35. Kim S, Murakami T, Izumi Y, Yano M, Miuya K, Yamanaka S, Iwao H. Extracellular signal-regulated kinase and c-jun NH₂-terminal kinase activities are continuously and differentially increased in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; **236**: 199-204.
36. Jun T, Ke-yan F, Catalano M. Increased superoxide anion production in human : a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hypertens.* 1996; **10**: 305-309.
37. Friedman J, Peleg E, Kagan T, Shnizer S, Rosenthal T. Oxidative stress in hypertensive, diabetic and diabetic hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2003; **16**: 1049-1052.
38. Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, de Champlain J. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am. J Hypertens.* 2003; **16**: 173-179.
39. Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2002; **105**: 387-392.

Footnotes

* This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 53074)

** To whom correspondence should be addressed

Abbreviations: 1K1C, one kidney-one clip, Ang II, angiotensin II, cAMP, cyclic adenosine monophosphate, C-ANP₄₋₂₃ [des(Gln¹⁸, Ser¹⁹, Glu²⁰, Leu²¹, Gly²²)ANP₄₋₂₃-NH₂], Gi, inhibitory guanine nucleotide regulatory protein, Gs, stimulatory guanine nucleotide regulatory protein, GTP γ S, Guanosine 5' O-(3-thiotriphosphate), SHR, spontaneously hypertensive rat, VSMC, vascular smooth muscle cells, WKY, Wistar-Kyoto rats.

Figure legends

Figure 1. Representative blot of $G\alpha$ -2 (A), $G\alpha$ -3 (B) and $G\alpha$ (C) protein expression in VSMC from 12 week-old WKY rats and SHR. Membrane proteins (30 μ g) from SHR and WKY VSMC were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose, which was immunoblotted with specific antibodies against $G\alpha$ -2, $G\alpha$ -3 and $G\alpha$ as described in “Methods”. Detection of G proteins was performed by using the chemiluminescence (ECL) Western blotting detection reagents. The blots are representative of three separate experiments.

Figure 2. Effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on $G\alpha$ -2 and $G\alpha$ -3 protein expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from SHR and WKY rats were treated with 5-20 mmol/L NAC for 24 hours. Membrane proteins (30 μ g) were separated and transferred to nitrocellulose, which was immunoblotted with specific antibodies against $G\alpha$ -2 (A) and $G\alpha$ -3 (B) as described in “Methods”. The blot is representative of five separate experiments. The graphs show quantification of protein bands by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of WKY control which has been taken as 100%. Data are mean \pm S.E.M (n=5). *p < 0.05 vs WKY, #p < 0.05 and ##p < 0.01 vs SHR.

Figure 3. Effect of diphenyleiodonium (DPI) on $G_{i\alpha-2}$ and $G_{i\alpha-3}$ protein expression in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from SHR and WKY rats were treated with 1-10 $\mu\text{mol/L}$ DPI for 24 hours. Membrane proteins (30 μg) were separated and transferred to nitrocellulose, which was immunoblotted with specific antibodies against $G_{i\alpha-2}$ (A) and $G_{i\alpha-3}$ (B) as described in "Methods". The blot is representative of five separate experiments. The graphs show quantification of protein bands by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of WKY control which has been taken as 100%. Data are mean \pm S.E.M (n=5). *p < 0.05 vs WKY, #p < 0.05 and ##p < 0.01 vs SHR.

Figure 4. Effect of low concentrations of $GTP\gamma S$ on forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old WKY and SHR. VSMC from SHR and WKY were treated with or without 20 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) (A) or 10 $\mu\text{mol/L}$ diphenyleiodonium (DPI) (B) for 24 hours. Membranes were prepared as described in "Methods" and adenylyl cyclase activity from these membranes was determined in the presence of 100 $\mu\text{mol/L}$ forskolin alone, taken as 100% and in the presence of various concentrations of $GTP\gamma S$ (10^{-13} mol/L – 10^{-7} mol/L). Adenylyl cyclase activities in the absence or presence of 100 $\mu\text{mol/L}$ forskolin in pmol cAMP/mg protein per 10 minutes were 177.3 \pm 5.7 (basal) and 14 212.2 \pm 1202.6 (FSK) for WKY, 104.3 \pm 5.7 (basal) and 11 154.7 \pm 987.1 (FSK) for WKY + NAC, 125.78 \pm 7.5 (basal) and 12 566.7 \pm 1333.7 (FSK) for WKY + DPI, 154.7 \pm 9.7 (basal) and 8765.3 \pm 245.9 (FSK) for SHR, 127.44 \pm 47.3 (basal) and 11 927.7 \pm 572.4 (FSK) for SHR +

NAC, 90.5 ± 7.5 (basal) and $11\ 091.8 \pm 1556.1$ (FSK) for SHR + DPI. Values are mean \pm S.E.M of four separate experiments. * $p < 0.05$ vs WKY and # $p < 0.05$ vs SHR.

Figure 5. Effect of AngII on adenylyl cyclase activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from WKY and SHR were treated with or without 20 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) or 10 μ mol/L diphenyleneiodonium (DPI) for 24 hours. Membranes were prepared as described in “Methods” and adenylyl cyclase activity from these membranes was determined in the presence of 10 μ mol/L GTP γ S alone (basal), taken as 100% and in the presence of 10^{-5} mol/L AngII. Enzyme activities in the presence of 10 μ mol/L GTP γ S alone in pmol cAMP/mg protein per 10 minutes were 6575.6 ± 501.8 for WKY, 4011.7 ± 124.7 for WKY + NAC, 4700.5 ± 343.6 for WKY + DPI, 4553.8 ± 276.4 for SHR, 4786.1 ± 455.7 for SHR + NAC, 4978.5 ± 199.7 for SHR + DPI. Values are mean \pm S.E.M of six separate experiments. * $p < 0.05$ between indicated bars.

Figure 6. Effect of C-ANP₄₋₂₃ on adenylyl cyclase activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from WKY and SHR were treated with or without 20 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) or 10 μ mol/L diphenyleneiodonium (DPI) for 24 hours. Membranes were prepared as described in “Methods” and adenylyl cyclase activity from these membranes was determined as in the presence of 10 μ mol/L GTP γ S alone (basal), taken as 100% and in the presence of various concentrations of C-ANP₄₋₂₃ (10^{-12} mol/L – 10^{-6} mol/L). Enzyme activities in the presence of 10 μ mol/L GTP γ S alone in pmol cAMP/mg protein per 10

minutes were 8047.9 ± 678.9 for WKY, 5584.6 ± 534.1 for WKY + NAC, 5120.8 ± 251.3 for WKY + DPI, 4914.4 ± 616.73 for SHR, 8253.4 ± 345.89 for SHR + NAC and 7145.6 ± 456.1 for SHR + DPI. Values are mean \pm S.E.M of six separate experiments. * $p < 0.05$ vs WKY and # $p < 0.05$ vs SHR.

Figure 7. Effect of GTP γ S on adenylyl cyclase activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from WKY and SHR were treated with or without 20 mmol/L N-acetyl-L-cysteines (NAC) or 10 μ mol/L diphenyleneiodonium (DPI) for 24 hours. Membranes were prepared as described in “Methods” and adenylyl cyclase activity from these membranes was determined in the presence of various concentrations of GTP γ S (10^{-8} mol/L- 10^{-5} mol/L). Enzyme activities in pmol cAMP/mg protein per 10 minutes were 104.28 ± 7.9 for WKY, 98.56 ± 8.9 for WKY + NAC, 118.66 ± 17.32 for WKY + DPI, 95.13 ± 16.26 for SHR, 78.67 ± 6.56 for SHR + NAC and 87.54 ± 11.43 for SHR + DPI. Values are mean \pm S.E.M of four separate experiments. * $p < 0.05$ vs WKY, SHR + NAC and SHR + DPI.

Figure 8. Effect of isoproterenol and sodium fluoride (NaF) on adenylyl cyclase activity in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. VSMC from WKY and SHR were treated with or without 20 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) or 10 μ mol/L diphenyleneiodonium (DPI) for 24 hours. Membranes were prepared as described in “Methods” and adenylyl cyclase activity from these membranes was determined in the presence of 50 μ mol/L

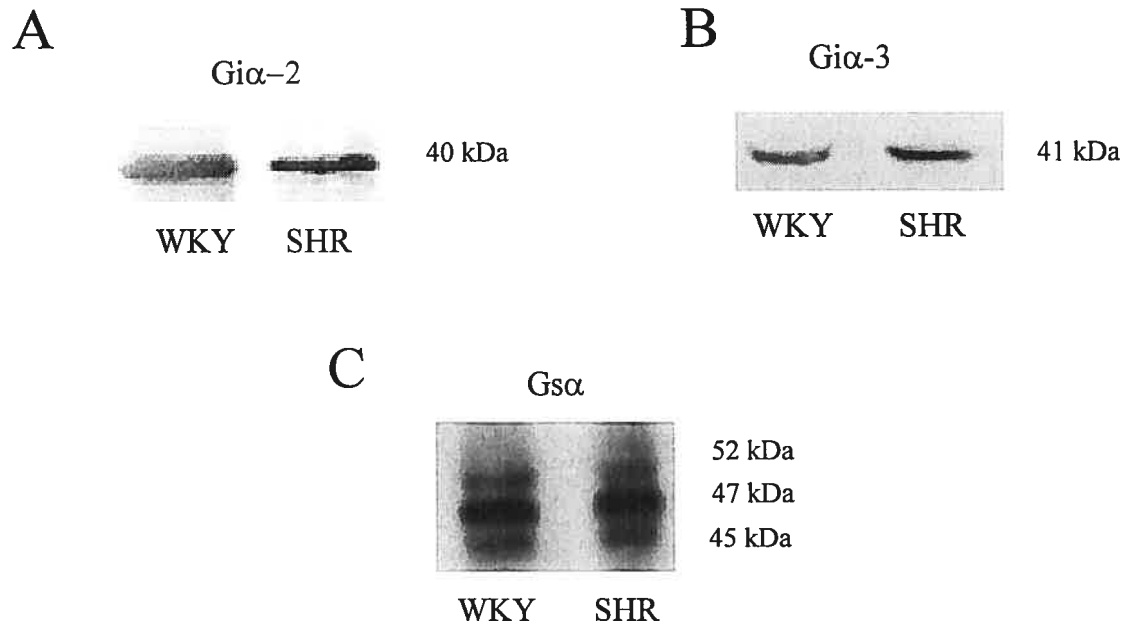
isoproterenol (A) or 10 mM NaF (B). Enzyme activities in the presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ GTP in pmol cAMP/mg protein per 10 minutes were 217.9 ± 66.56 for WKY, 338.22 ± 24.45 for WKY + NAC, 300.45 ± 55.32 for WKY + DPI, 225.45 ± 45.74 for SHR, 337.56 ± 78.11 for SHR + NAC, 267.56 ± 61.45 for SHR + DPI. Values are mean \pm S.E.M of four separate experiments. ** $p < 0.01$ between indicated bars.

Figure 9. Effect of PD98059 on $G_i\alpha$ -2 and $G_i\alpha$ -3 protein expression in VSMC from 12 week-old SHR and age-matched WKY rats. Confluent VSMC from SHR and WKY rats were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ PD098059 for 24 hours. Membrane proteins (30 μg) were separated and transferred to nitrocellulose, which was immunoblotted with specific antibodies against $G_i\alpha$ -2 (A) and $G_i\alpha$ -3 (B) as described in “Methods”. The autoradiogram is representative of three separate experiments. Detection of Gi protein α -subunit was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. WKY levels were taken as 100%. Data are mean \pm S.E.M (n=5). * $p < 0.05$ compared with WKY, # $p < 0.05$ compared with SHR.

Figure 10. Effect of NAC and DPI on ERK 1/2 phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC) from 12 week-old SHR and WKY rats. Confluent VSMC from SHR and WKY rats were treated with 20 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) or 10 $\mu\text{mol/L}$ diphenyleiodonium (DPI) for 24 hours. Cell lysates were immunoblotted by phospho-specific-Tyr²⁰⁴-ERK1/2 antibodies as shown on the top panel. Blots were also analyzed for total ERK1/2 (bottom panel) as described in “Methods”. The blots are representative of three separate experiments. Detection of p-ERK1/2 and total ERK1/2

was performed with chemiluminescence Western blotting detection reagents. WKY levels were taken as 100%. Data are mean \pm S.E.M (n=3). ***p < 0.001 vs WKY and ###p < 0.001 vs SHR.

Figure 11. Schematic presentation of possible mechanisms involving AngII, oxidative stress and MAPK in enhanced expression of Gi α proteins in hypertension.

**Fig. 1**

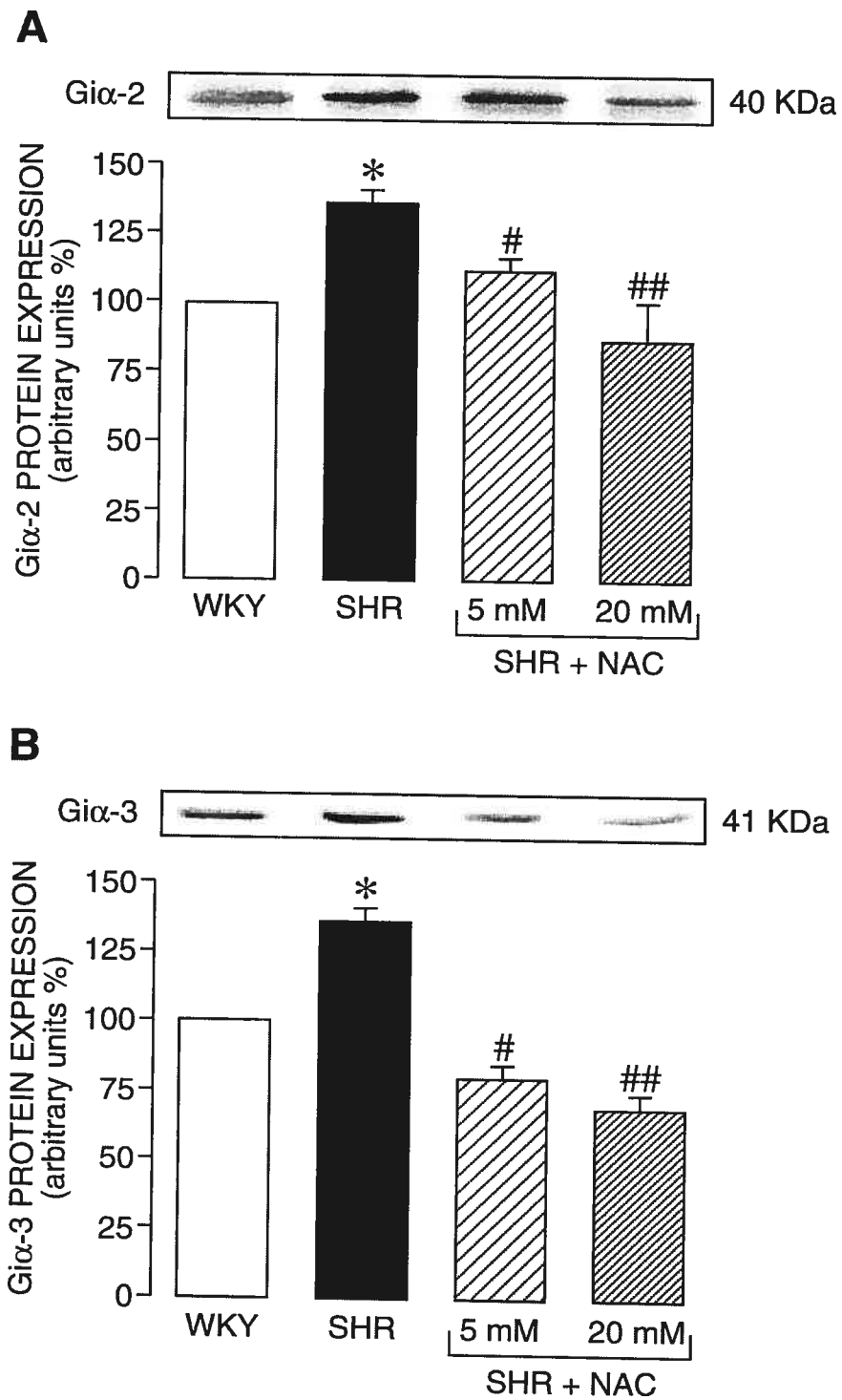


Fig. 2

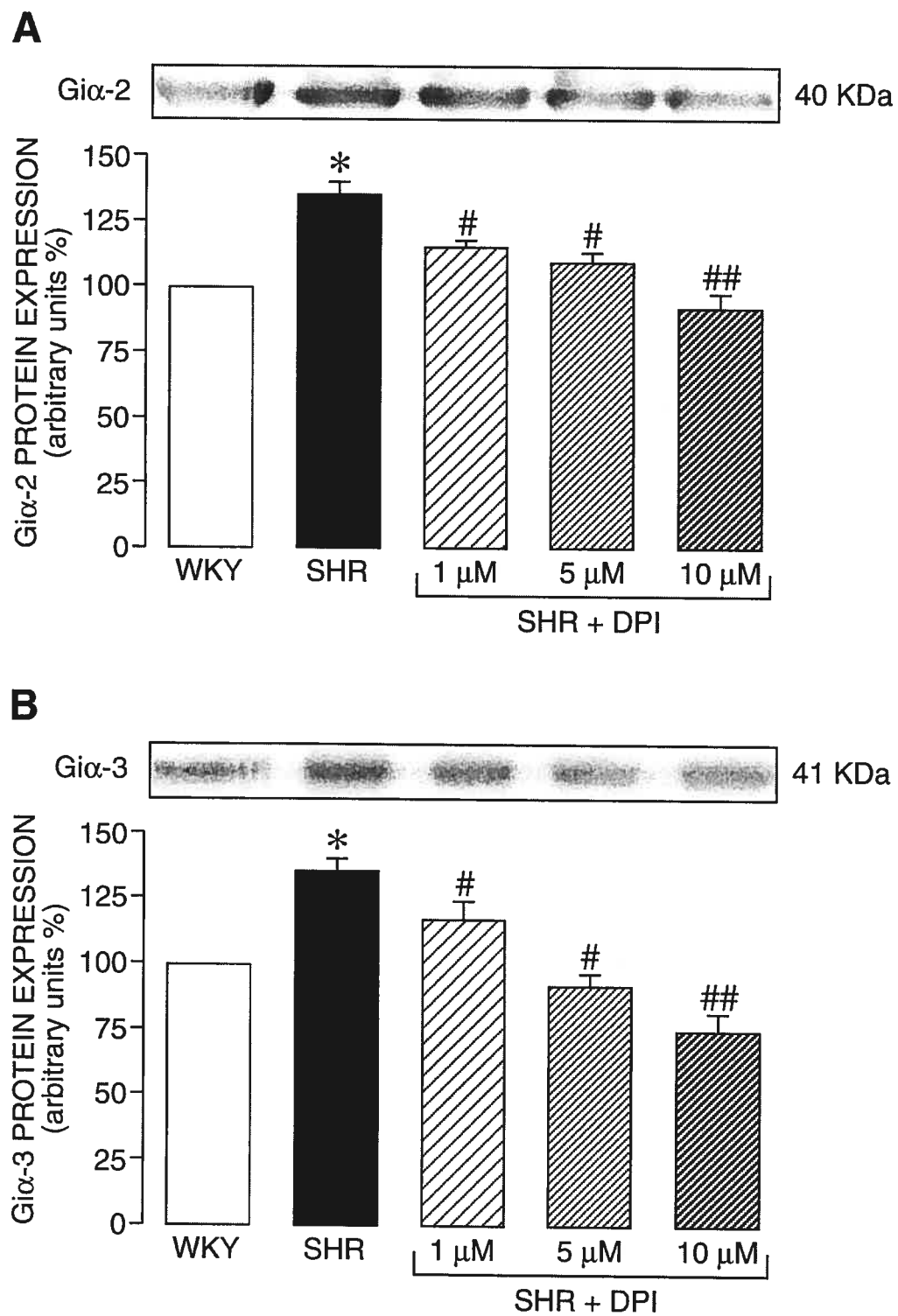


Fig. 3

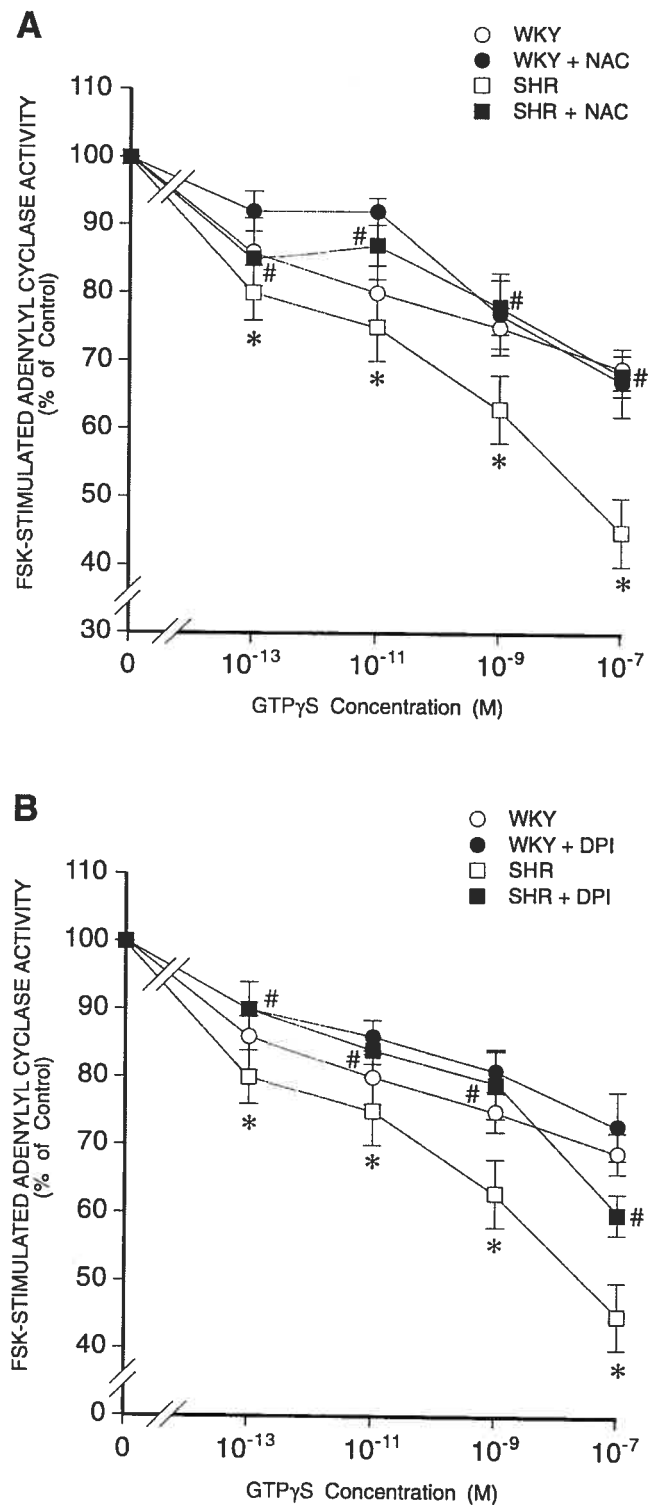


Fig. 4

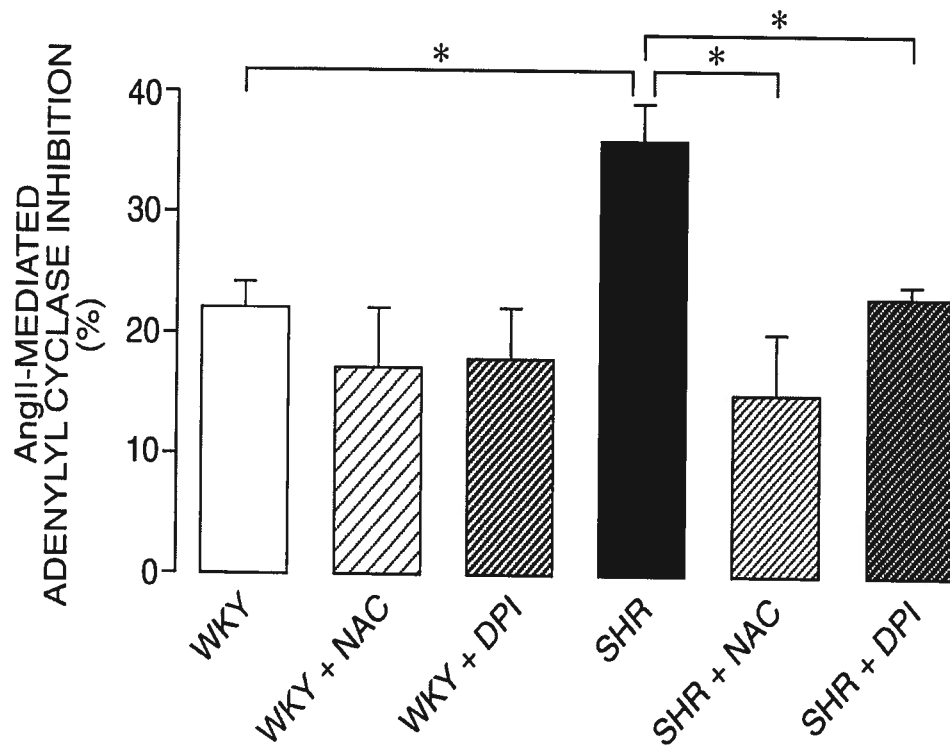


Fig. 5

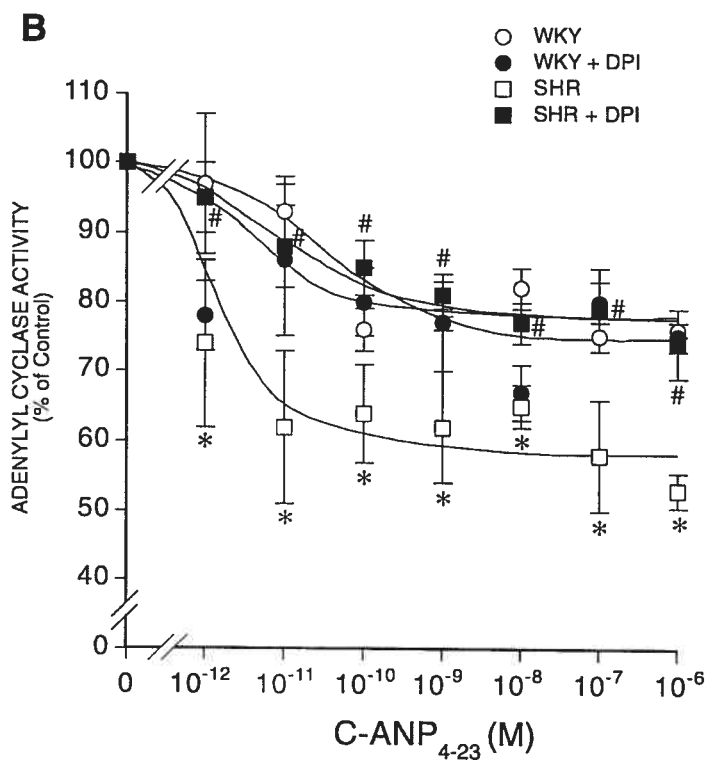
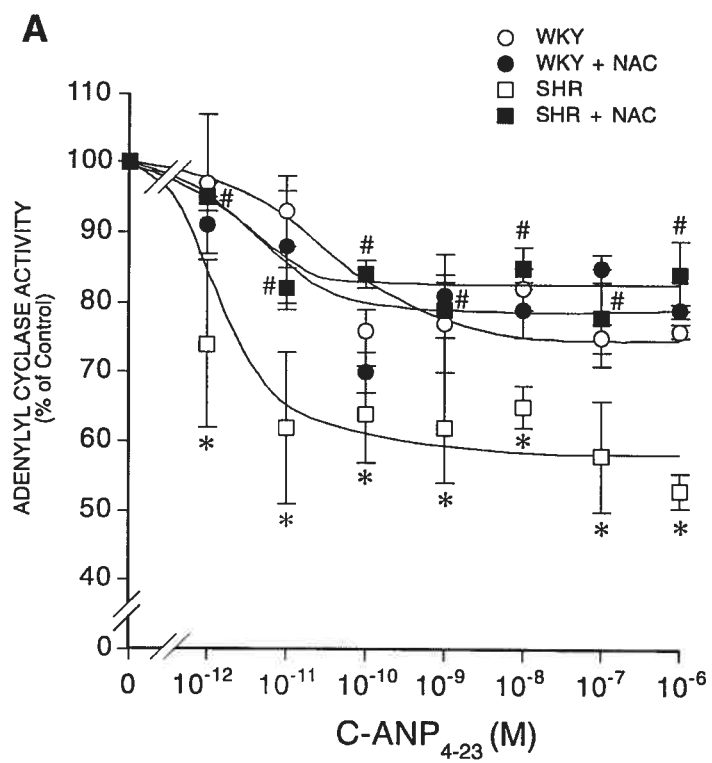


Fig. 6

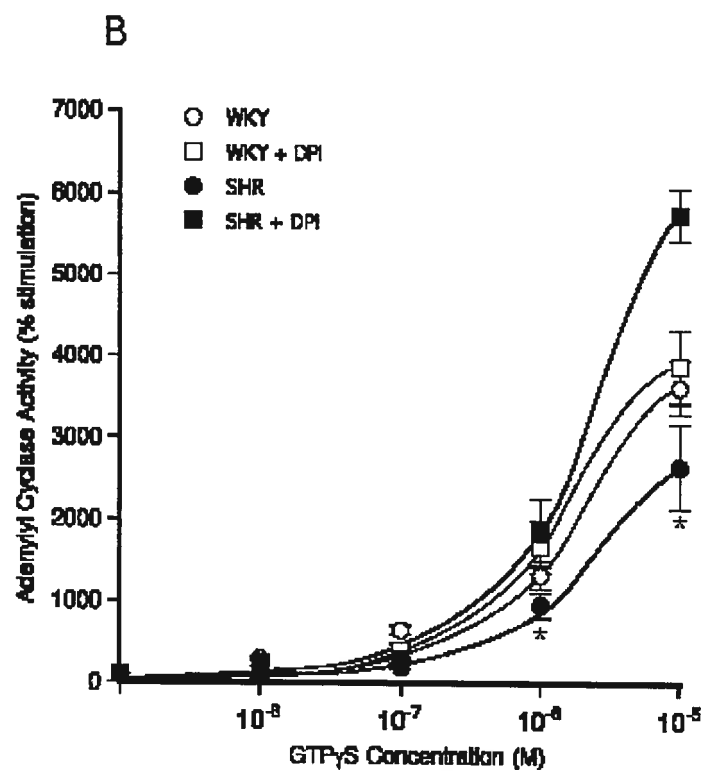
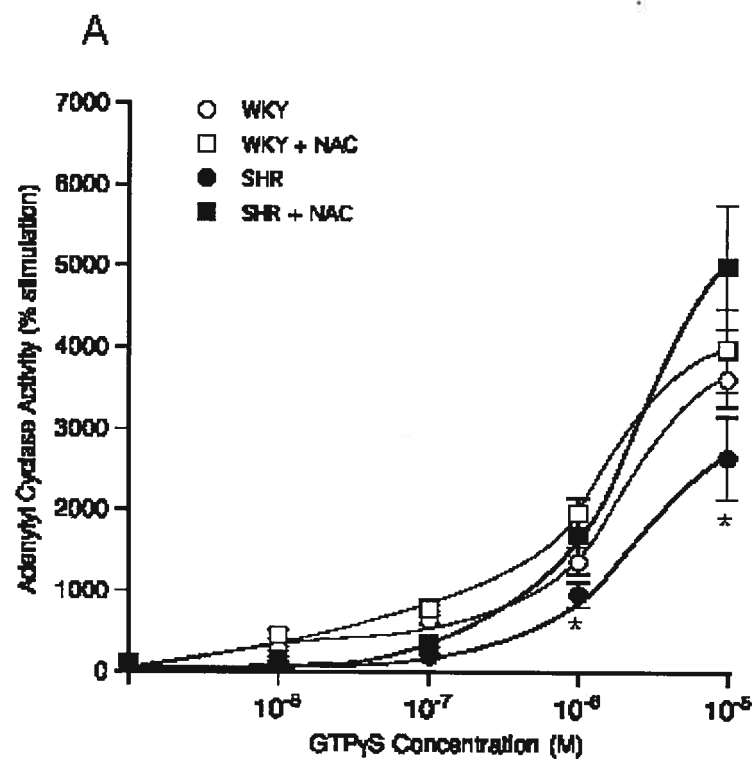


Fig. 7

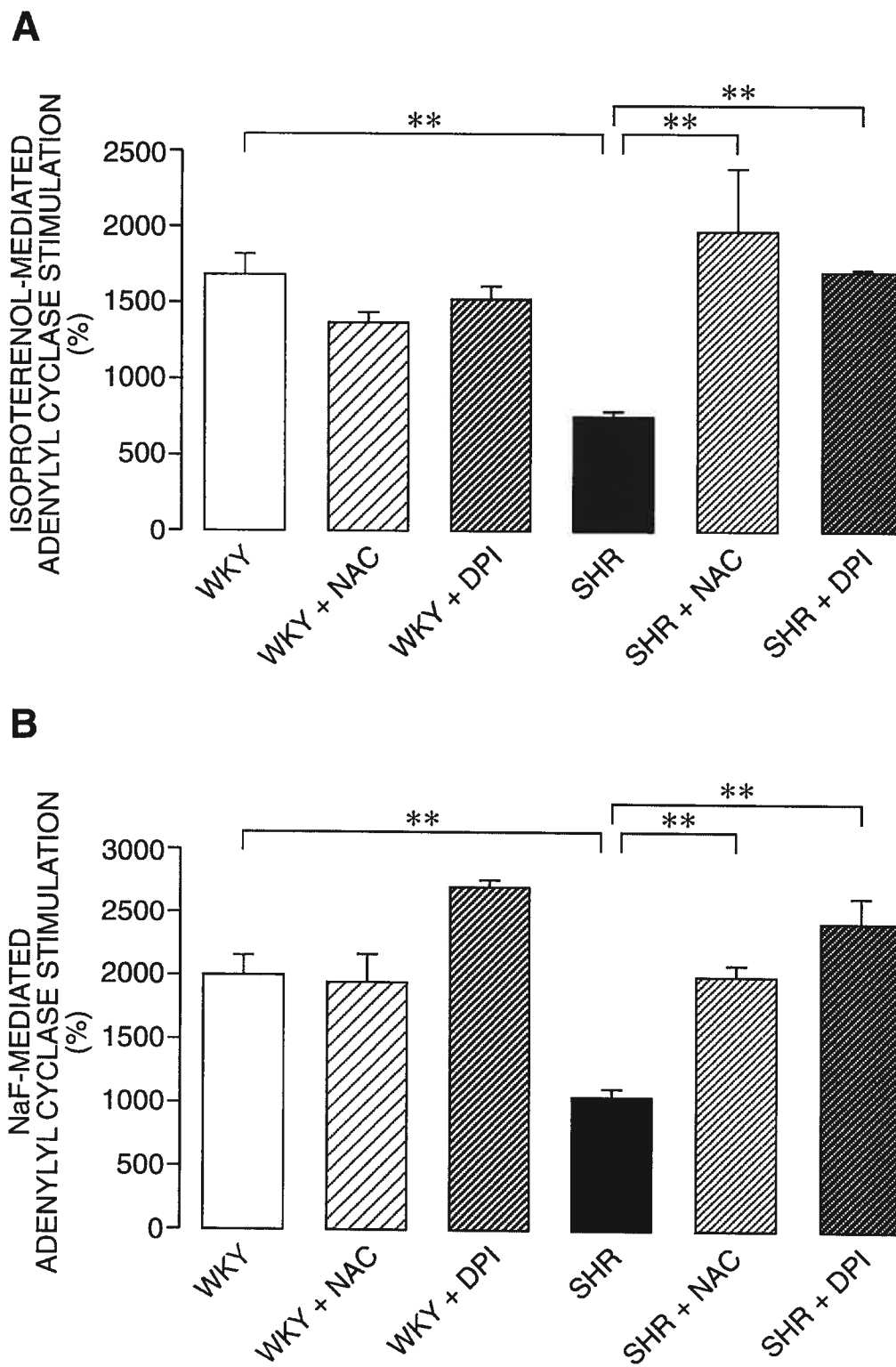


Fig. 8

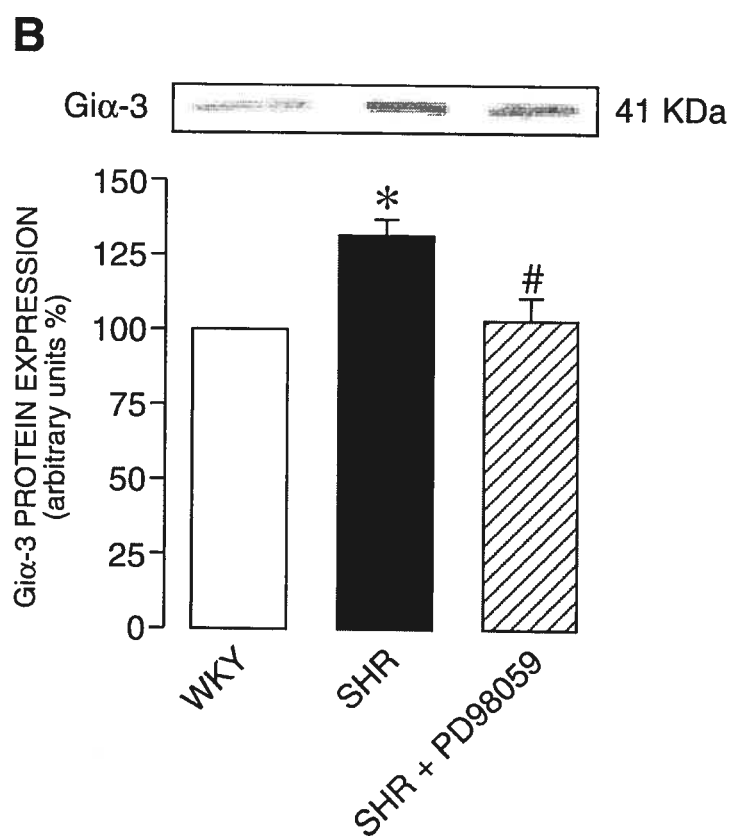
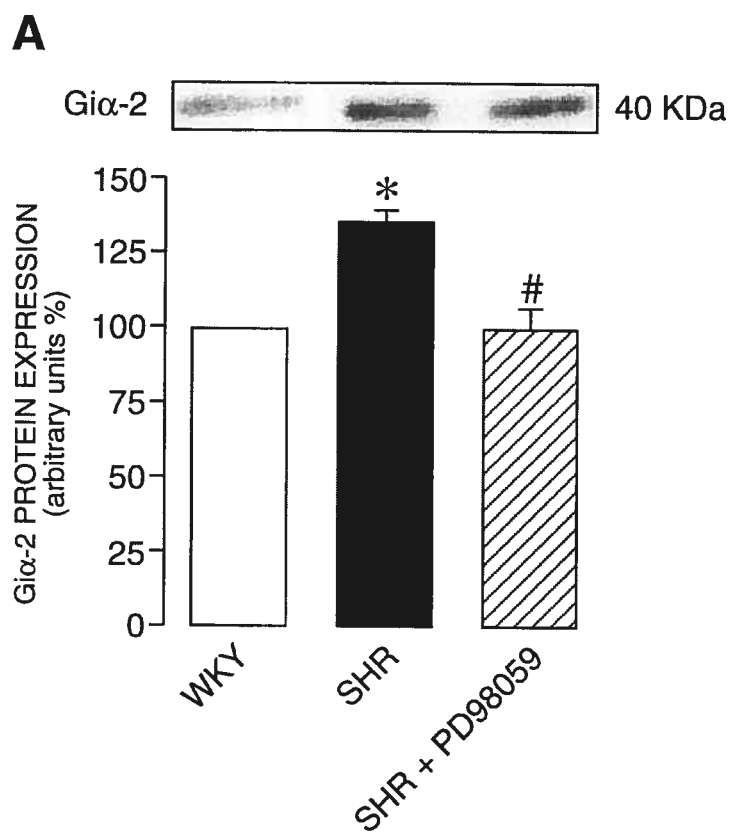


Fig. 9

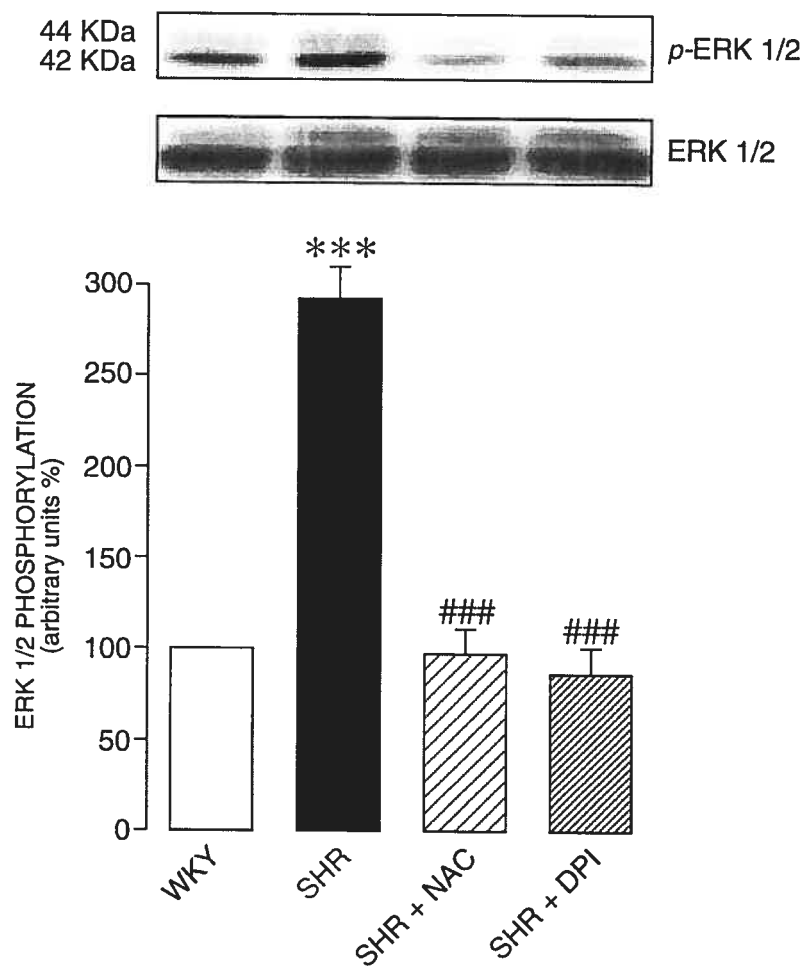
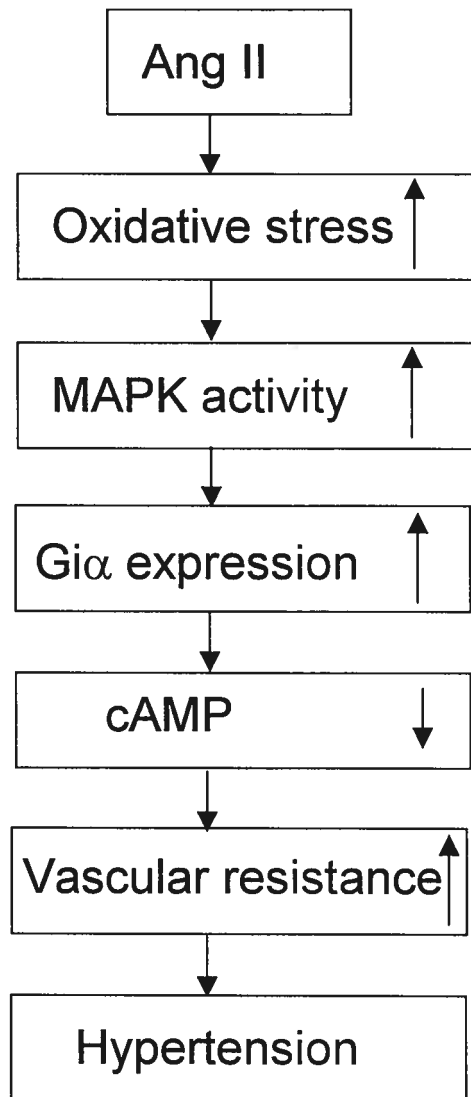


Fig. 10

**Fig. 11**

Chapitre 3

Discussion générale et conclusion

Discussion

Dans ces études, nous montrons qu'il y a une augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV des SHR comparé aux CMLV des rats WKY tandis que les niveaux de $G\alpha$ demeurent inchangés. Ces études sont en accord avec des études précédentes effectuées par notre laboratoire chez des rats WKY et SHR (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992) ainsi que dans d'autres modèles d'hypertension comme le model DOCA-sel (Anand-Srivastava 1992) et 1K-1C (Ge et al. 1999). Nous avons utilisé des CMLV d'aortes de rats WKY et SHR de 12 semaines afin de s'assurer que les rats sont hypertendus et qu'il y a augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ dans les CMLV de SHR. Une augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ est observée autour de la deuxième semaine de vie (Li et Anand-Srivastava 2002) tandis que l'hypertension apparaît à six semaines.

L'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV des SHR a été abolie lorsque celles-ci ont été traitées avec un antioxydant, soit NAC ou DPI, suggérant que le stress oxydatif est un facteur contribuant à l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV des SHR (Fig 2 et 3, p 74 et 75).

Tel qu'attendu, l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 a eu aussi un effet sur l'activité de l'adénylate cyclase (Fig 4-8, pp 76-80). En effet, nous avons observé une augmentation de l'inhibition de l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline

en présence de faibles quantités de GTP γ S (un analogue non-hydrolysable du GTP, qui à des faibles concentrations, active G_i, mais active G_s à de plus grandes concentrations) dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV des rats WKY comme décrit dans des études antérieures (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992, Ge et al. 1999). Ce phénomène peut être attribuable à une augmentation de l'expression des protéines G_i puisqu'un antioxydant qui diminue l'expression des protéines G α -2 et G α -3 s'est aussi avéré capable de restaurer l'inhibition par le GTP γ S sur l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline vers des niveaux de WKY.

Nous avons aussi observé une augmentation de l'inhibition de l'adénylate cyclase par des hormones inhibitrices comme l'AngII (Fig 5, p 77) et le C-ANP₄₋₂₃ (fig 6, p 78, un analogue du PNA) dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV des rats WKY. Cette observation est en accord avec des études précédentes effectuées par notre laboratoire (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992, Ge et al. 1999). L'augmentation de l'expression des protéines G α -2 et G α -3 semble être responsable de ceci parce que lorsque des CMLV de SHR sont traitées avec un antioxydant, lesquels réduisent les taux d'expression des protéines G α -2 et G α -3 à des niveaux témoins (fig 2 et 3, pp 74 et 75), l'augmentation de l'inhibition de l'adénylate cyclase par AngII et C-ANP₄₋₂₃ est abolie.

De plus, nous avons observé une diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase par le GTP γ S dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV des rats WKY. Ces résultats sont en accord avec des études préalables effectuées par notre laboratoire (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992, Ge et al. 1999). L'augmentation de l'expression des

protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ semble être responsable de la diminution de la stimulation et non les niveaux de $G_{s\alpha}$ car les niveaux de $G_{s\alpha}$ ne changent pas. Les antioxydants NAC et DPI ont été capables d'abolir la diminution de la stimulation par le $GTP\gamma S$ dans les CMLV des SHR.

La diminution de la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase par l'isoprotérénol dans les CMLV des SHR comparé aux CMLV des rats WKY est consistante avec des observations antérieures (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992, Ge et al. 1999) et peut être attribuable à la diminution du nombre de récepteurs (Limas et Limas 1978), une sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase déficiente ou à un mauvais couplage récepteur/protéine Gs/adénylate cyclase. Puisque les niveaux de $G_{s\alpha}$ ne sont pas changés, il est fort probable que la diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase par l'isoprotérénol soit due à une augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$. Cette hypothèse est soutenue par le fait que lorsque les CMLV de SHR sont traitées avec un antioxydant, la réponse de l'adénylate cyclase à l'isoprotérénol retourne au même niveau que les CMLV des rats WKY. Une diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase par le NaF dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV des rats WKY a aussi été observée et est aussi consistante avec des études préalables (Anand-Srivastava et al. 1991, Anand-Srivastava 1992, Ge et al. 1999). La diminution de la stimulation est attribuable à une augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ ou à une sous-unité de l'adénylate cyclase défectueuse ou les deux. Puisque un antioxydant est capable de restaurer les niveaux des protéines $G_{i\alpha}$ et la stimulation de l'adénylate cyclase par le NaF au même niveau que les CMLV des rats WKY dans les CMLV de SHR, il est

suggéré que la diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase par NaF dans ces cellules est attribuée à l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$. Bref, les stress oxydatif semble être un facteur contribuant à l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV des rats WKY.

Nous avons par la suite étudié par quel mécanisme le stress oxydatif contribue à augmenter l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ dans les SHR. Une étude préalable à celle-ci montre que la voie des MAPK est impliquée dans l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ induite par l'Ang II dans les cellules A10 (Ge et Anand-Srivastava 1998). Puisque les niveaux de l'Ang II sont augmentés dans les SHR et que l'Ang II augmente l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ ainsi que le stress oxydatif, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur des MAPK sur l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ dans les CMLV des SHR et WKY. Le PD98059, un inhibiteur des MAPK, a aboli l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ observée dans les CMLV de SHR. Ce résultat suggère que la voie des MAPK est possiblement impliquée dans l'augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ dans les CMLV de SHR. En effet, il y a une augmentation de l'activation de la voie des MAPK dans les CMLV des SHR car il y a une plus grande phosphorylation de ERK1/2. L'augmentation de l'activation de la voie des MAPK a été abolie par le NAC et le DPI suggérant que les ERO activent la voie des MAPK qui elle, induit une plus grande expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$.

Conclusion

Pour conclure, il y a une augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV de SHR de 12 semaines comparé aux CMLV des rats WKY de même âge. L'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 a eu un effet sur l'activité de l'adénylate cyclase. En effet, il y a eu une plus grande inhibition de l'adénylate cyclase par l'Ang II et le C-ANP₄₋₂₃ dans les CMLV des SHR comparé aux CMLV des rats WKY. Il y a eu aussi une plus grande inhibition par le $GTP\gamma S$ de l'activité de l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline dans les CMLV de SHR. De plus, il y a eu une diminution de la stimulation de l'adénylate cyclase par le $GTP\gamma S$, l'isoprotérenol et le NaF dans les CMLV de SHR comparé aux CMLV de WKY. L'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 ainsi que l'altération de l'activité de l'adénylate cyclase ont été restaurés vers les niveaux WKY par les antioxydants NAC et DPI. Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans SHR. De plus, le PD98059, un inhibiteur de la voie des MAPK a complètement inhibé l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV. Aussi, il y a une plus grande activation de ERK 1/2 dans les CMLV des SHR comparé aux CMLV des rats WKY et cette activation a été rétablie vers les niveaux WKY par le NAC et le DPI. Bref, ces résultats suggèrent que le stress oxydatif, via l'activation de la voie des MAPK, joue un rôle dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les SHR.

Perspectives

À la lumière de ces découvertes, plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Est-ce qu'il existe d'autres voies de signalisation utilisées par le stress oxydatif pour augmenter l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les SHR? En effet, l'implication de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3-K) dans l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 induite par l'Ang II a aussi été suggérée (Ge et Anand-Srivastava 1998). Il serait intéressant de vérifier l'effet d'un inhibiteur de la PI-3-K (wortmanine) sur l'expression des protéines $G\alpha$ -2 et $G\alpha$ -3 dans les CMLV de SHR. De plus, il n'est pas encore connu si le stress oxydatif est une cause ou une conséquence de l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ dans les SHR. Pour répondre à cette question, il faudrait mesurer le stress oxydatif par la mesure de l'anion superoxyde dans les cœurs et aortes de rats SHR néonataux et voir si le stress oxydatif est augmenté avant ou après l'augmentation de l'expression des protéines $G\alpha$ qui se fait autour de la deuxième semaine de vie. Finalement, il serait intéressant de connaître l'effet des antioxydants sur l'expression des protéines $G\alpha$ dans des modèles d'hypertension non-génétiques comme le modèle DOCA-sel, 1K-1C ou un modèle d'hypertension induit par infusion d'Ang II.

Références

- Abe J, Kusuvara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee DJ. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 16586-16590.
- Alberts B and Bray D. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, 1989.
- Amer MS. Cyclic adenosine monophosphate and hypertension in rats. *Science*. 1973; **179**: 807-809.
- Anand-Srivastava MB. Altered responsiveness of adenylate cyclase to adenosine and other agents in the myocardial sarcolemma and aorta of spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol.* 1988; **37**: 3017-3022.
- Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats: relationship to adenylate cyclase inhibition. *Biochem J.* 1992; **288**: 79-85.
- Anand-Srivastava MB. Platelets from spontaneously hypertensive rats exhibit decreased expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein: Relation with adenylate cyclase activity. *Circ. Res.* 1993; **73**: 1032-1039.
- Anand-Srivastava MB, de Champlain J, Thibault C. DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am. J. Hypertens.* 1993; **6**: 71-75.
- Anand-Srivastava MB, Palaparti A. Angiotensin-II-induced enhanced expression of Gi proteins is attenuated by losartan in A10 vascular smooth muscle cells: role of AT1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003; **81**: 150-158.

Anand-Srivastava MB, Picard S, Thibault C. Altered expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein (G α) in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 1991; **4**: 840-843.

Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ. β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 17882-17890.

Bakalyar HA, Reed RR. Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science.* 1990; **250**: 1403-1406.

Balasubramanian S, Teissere J, Raju DV, Hall RA. Hetero-oligomerization between GABA_A and GABA_B receptors regulates GABA_B receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* 2004; **18**: 18840-18850.

Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM. Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 1998; **38**: 256-262.

Bockaert J and Pin JP. Molecular tinkering of G-protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999; **18**: 1723-1729.

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science.* 1990; **249**: 64-67.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 1991; **65**: 663-675.

Breit A, Legace M, Bouvier M. Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 56-65.

Breitwieser GE. G protein-coupled receptor oligomerization: Implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res.* 2004; **94**: 17-27.

Bunneman M and Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J. Physiol.* 1999; **517**: 5-23.

Cai H and Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; **87**: 840-844.

Caldwell KK, Boyajian CL, Cooper DMF. The effects of Ca^{2+} and calmodulin on adenylyl cyclase activity in plasma membranes derived from neural and non-neural cells. *Cell Calcium.* 1992; **13**: 107-121.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979; **59**: 527-605.

Chen CA and Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene.* 2001; **20**: 1643-1652.

Chien S, Li S, Shyy YJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension.* 1998; **31**: 162-169.

Clapham DE and Neer EJ. G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; **37**: 167-203.

Choi EJ, Xia Z, Storm DR. Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry.* 1992; **31**: 6492-6498.

Cooper DMF, Mons N, Karpen JW. Adenylyl cyclase and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature*. 1995; **374**: 421-424.

Cooper DMF. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J*. 2003; **375**: 517-529.

De Vivo M, Iyengar R. G protein pathways : signal processing by effectors. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1994; **100**: 65-70.

Dinauer MC, Deck MB, Unanue ER. Mice lacking reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity show increased susceptibility to early infection with *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol*. 1997; **158**: 5581-5583.

Dohlman HC, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem*. 1991; **60**: 653-688.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*. 2002; **82**: 47-95.

Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, Hoidal JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J. Clin. Invest*. 1992; **89**: 197-202.

Fantus G, Kadota S, Deragon G, Foster B, Posner BI. Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocytes via activation of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry*. 1989; **28**: 8864-8871.

Feldman AM, Cates AE, Bristow MR, Van Dop C. Altered expression of α -subunits of G-proteins in failing human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1989; **21**: 359-365.

- Feraille E and Doucet A. Sodium-potassium adenosine triphosphatase-dependant sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* 2001; **81**: 345-418.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases and related matters. *J. Biol. Chem.* 1997; **272**: 18515-18517.
- Ge C and Anand-Srivastava MB. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in AII-mediated enhanced expression of Gi proteins in vascular smooth muscle cells. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 1998; **251**: 570-575.
- Ge C, Garcia R, Anand-Srivastava MB. Altered expression of Gi-protein and adenylyl cyclase activity in hearts from one kidney one clip hypertensive rats: effect of captopril. *J Hypertens.* 1999; **17**: 1617-1626.
- Gilman AG. G-protein and dual control of adenylyl cyclase. *Cell.* 1984; **36**: 577-579.
- Gilman AG. G-proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; **56**: 415-449.
- Gopalarishna R and Anderson WB. Ca^{2+} - and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; **86**: 6758-6762.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; **74**: 1141-1148.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000; **86**: 494-501.

Gudermann T and Nürnberg B. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. *J. Mol. Med.* 1995; **73**: 51-63.

Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 669-672.

Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut.* 2003; **52**: 144-151.

Itoh H, Toyama R, Kozasa T, Matsuoka M, Kaziro Y. Presence of three distinct molecular species of G protein: a subunit structure of rat cDNA and human genome DNAs. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 6654-6664.

Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y. Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 12841-12484.

Jennemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouet JM, Coro P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 1992; **71**: 169-180.

Johnson M. The β -adrenoreceptor. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; **158**: S146-S153. »

Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OTG. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996; **271**: H1626-H1634.

Kim EJ, Kim HP, Hah YC, Roe JH. Differential expression of superoxide dismutase containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces Coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* 1996; **241**: 178-189.

- Kohout TA and Lefkowitz RJ. Regulation of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Molecular Pharmacology*. 2003; **63**: 9-18.
- Krupinski J. The adenylyl cyclase family. *Mol. Cell. Biochem*. 1991; **104**: 73-79.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001; **81**: 807-869.
- Lai HL, Lin TH, Kao YY, Lin WJ, Hwang MJ, Chern Y. The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C. *Mol. Pharmacol*. 1999; **56**: 644-650.
- Laragh JH. The renin system and four lines of hypertension research. *Hypertension*. 1992; **20**: 267-279.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*. 1998; **74**: 49-139.
- Li Y and Anand-Srivastava MB. Inactivation of enhanced expression of G(i) proteins by pertussis toxin attenuates the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 2002; **91**: 247-254.
- Lilly LS. Pathophysiology of heart disease 3rd edition. Lippincott William & Wilkins. Baltimore. 2003.
- Limas C, Liman CJ. Reduced number of β -adrenergic receptors in the myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1978; **83**: 710-714.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase

dependence and receptor specificity of β -arrestin and arrestin in the β 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 8558-8564.

Lynch CJ, Blackmore PF, Johnson EH. Guanine nucleotide binding regulatory proteins and adenylate cyclase in livers of streptozotocin- and BB/W or-Diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1989; **83** : 2050-2062.

Marcil J, Thibault C, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi protein precedes the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997; **29** : 1009-1022.

Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines 2e edition*. Montréal : ERPI, 1999.

McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 1969; **244**: 6049-6055.

Mittal CK and Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3,5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; **74**: 4360-4364.

Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med. Sci. Monit.* 2002; **8**: RA210-215.

Okamoto K and Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 1963; **27**: 282-293.

Palaparti A, Ge C, Anand-Srivastava MB. Angiotensin II enhances the expression of Gi α in A10 cells (smooth muscle): Relationship with adenylyl cyclase activity. *Arch Biochem Biophys.* 1999; **365**: 113-122.

- Pandey SK, Anand-Srivastava MB. Modulation of G-protein expression by the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril in heart from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 1996; **9**: 833-837.
- Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist V, Ballinger CA, Braiser AR, Bode C, Runge MS. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47phox may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 19814-19822.
- Pearson G, Robinson F, Beers GT. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; **22**: 153-183.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987; **92**: 639-646.
- Ramanathan S and Shubata S. Cyclic AMP in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels.* 1974; **11**: 312-318.
- Robishaw JD, Smigel MD, Gilman AG. Molecular basis for two forms of the G-protein that stimulates adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 1988; **261**: 9857-9590.
- Salahpour A, Angers S, Mercier JF, Legace M, Marullo S, Bouvier M. Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 33390-33397.
- Simonds WF. G protein regulation of adenylate cyclase. *TiPS.* 1999; **20**: 66-73.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. Crystal structure of GA protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1 resolution. *Nature*; **379**: 369-374.

- Spiegel AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol and Cell Endocrinol.* 1987; **49**: 1-16.
- Sundaresan M, Zu-Xi Y, Ferras VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 1995; **270**: 296-299.
- Toews ML, Prinster SC, Schulte NA. Regulation of alpha-1B adrenergic receptor localization, trafficking, function and stability. *Life Sciences.* 2003; **74**: 379-389.
- Triner Z, Vulliemoz Y, Verosky M, Habif DV, Nahas W. Adenylate cyclase phosphodiesterase system in arterial smooth muscle. *Life Science.* 1972; **11**: 817-824.
- Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Goldstein M, Masuyama Y. Modulation of [³H]dopamine release by neuropeptide Y in rat striatal slices. *Eur J Pharmacol.* 1997; **321**: 5-11.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. P22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 23317-23321.
- Vazquez-Prado, Casas-Gonzalez P, Garcia-Sainz JA. G-protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cellular Signalling.* 2003; **15**: 549-557.
- Voet D et Voet G. *Biochimie 2^e édition.* Paris: DeBoeck, 1998.
- Wang F, Wang L, Zheng TL, Towes ML. Identification of distinct carboxyl-terminal domains mediating internalization and down-regulation of the hamster α_{1B} -adrenergic receptor. *Molecular Pharmacology.* 2000; **57**: 687-694.

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001; **19** :741-748.

Youn HD, Youn H, Lee JW. Unique enzyme of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996; **334**: 341-348.