

Université de Montréal

La signalisation redox en hypertension artérielle

Par

Fatiha Tabet

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de
l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en
Pharmacologie

Décembre 2006

Fatiha Tabet, 2007

Université de Montréal



W
4
U58
2007
V.115

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.

Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

La signalisation redox en hypertension artérielle

Présentée par :

Fatiha Tabet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Denis deBlois, Président-rapporteur

Dr Rhian M. Touyz, Directeur de recherche

Dr Ernesto L. Schiffrin, Co-directeur de recherche

Dr Timothy L. Reudelhuber, Membre du jury

Dr Darren E. Richard, Examineur externe

Dr Michèle Brochu, Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Chez l'être humain, l'hypertension essentielle est associée à une augmentation de la résistance périphérique vasculaire principalement due à une réduction du diamètre de la lumière des petites artères de résistance. Ces dernières jouent un rôle important dans le développement de l'hypertension artérielle et subissent des changements de structure et de fonction qui contribuent aux complications et dommages vasculaires. Ces changements incluent le remodelage vasculaire, la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), la dysfonction endothéliale, les modifications de tonus vasculaire et l'inflammation. Depuis une dizaine d'années, beaucoup d'intérêt est accordé aux rôles des dérivés réactifs de l'oxygène (DROs) dans les dommages vasculaires liés à l'hypertension artérielle. Les DROs sont des molécules dérivées de la réduction de l'oxygène et sont présentement reconnus comme des molécules de la signalisation intracellulaire qui, dans les conditions physiologiques normales, sont impliqués dans le maintien de la fonction et intégrité vasculaire. Dans les conditions pathophysiologiques, les DROs contribuent aux dommages vasculaires à travers leur potentiel d'oxydation/réduction (redox) et par la modification oxydative des protéines. Dans le modèle de rat spontanément hypertendu SHR, il a été démontré que le niveau de stress oxydant était augmenté. Le but de nos études était donc d'évaluer le rôle des DROs dans la régulation de la signalisation calcique et de la contraction vasculaire dans le modèle SHR en comparaison avec le modèle normotendus WKY. Puisque la phosphorylation des protéines sur leurs résidus tyrosines est un des mécanismes les plus importants dans le contrôle des voies de signalisation intracellulaires menant à la prolifération,

différenciation et croissance cellulaire, nous avons identifié certaines des voies de l'activation des MAP kinases, protéines importantes dans la croissance des CMLVs, par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De plus, nous avons évalué si ces voies de signalisation étaient altérées en hypertension artérielle. Finalement et considérant le fait que les niveaux de phosphotyrosines cellulaires étaient régulés par l'activité antagoniste des protéines tyrosines kinases et des protéines tyrosines phosphatases (PTPs), nous avons évalué si le peptide vasoactif Angiotensine II (Ang II), qui joue un rôle important dans le remodelage vasculaire en hypertension, induisait l'inactivation/oxydation des PTPs dans les CMLVs. Nous avons évalué si cette inactivation pouvait affecter les voies de signalisation intracellulaires menant à la croissance des CMLVs en hypertension. Nos études démontrent que les DROs augmentent les concentrations de calcium (Ca^{2+}) intracellulaires et induisent une augmentation de la contraction vasculaire chez les SHR comparativement aux WKY. Ces effets sont principalement dues à l'influx du Ca^{2+} extracellulaire via les canaux calciques de type L. Ces résultats s'expliquent par le fait qu'il y a une augmentation de l'expression génique et protéique des canaux calciques de type L dans le modèle SHR. De plus, nous démontrons que le H_2O_2 augmente la phosphorylation des MAP kinases chez le SHR par des mécanismes dépendants des protéines tyrosines kinases et indépendants de la protéine kinase C. Finalement, nous démontrons pour la première fois, que l'Ang II induit une augmentation de l'oxydation/inactivation de plusieurs PTPs, incluant SHP-2, dans les CMLVs des rats SHR et que la régulation à la baisse de SHP-2 est associée à l'augmentation de la signalisation de AKT par l'Ang II. Nos résultats soulignent l'importance des DROs comme molécules de signalisation intracellulaires contribuant aux dommages vasculaires en hypertension artérielle.

Mots clés : Hypertension essentielle, dérivés réactifs de l'oxygène, Angiotensine II, signalisation calcique, croissance des CMLVs, oxydation des PTPs.

ABSTRACT

Human essential hypertension is characterized by increased peripheral vascular resistance to blood flow, due largely to reduced lumen diameter of resistance vessels. The small arteries and arterioles that determine peripheral vascular resistance undergo structural and functional changes that contribute to the vascular damage in hypertension. These changes include vascular remodeling, increased growth of vascular smooth muscle cells (VSMCs), endothelial dysfunction, increased reactivity to contractile agents and inflammation. Over the last decade, the contribution of reactive oxygen species (ROS) in the vascular damage in hypertension has been the subject of much research interest. ROS are highly reactive byproducts of O₂ metabolism and are presently recognized as intracellular signaling molecules that regulate vascular function and integrity. Under pathological conditions ROS contribute to vascular dysfunction and remodeling through their oxidation/reduction (redox) potential and through oxidative modification of proteins. It has been clearly established that in human hypertension and in many animal models of hypertension (including the spontaneously hypertensive rat model SHR), there is an increase in the bioavailability of ROS. The aims of our studies were to determine the role of ROS, particularly hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion ([•]O₂⁻) in the regulation of VSMC Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and vascular contraction and to assess whether redox-dependent Ca²⁺ signaling and contraction are altered in hypertension. Since the phosphorylation of proteins on tyrosine residues is one of the most important regulatory cell signaling mechanisms, controlling cell proliferation, differentiation and migration, we investigated putative molecular mechanisms underlying MAP kinases

activation by H_2O_2 in VSMCs and evaluated whether H_2O_2 -induced actions are altered in SHR cells. Finally, and considering the fact that cellular phosphotyrosine levels are regulated by the antagonistic activities of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases (PTPs), we evaluated whether the vasoactive peptide Ang II, important in vascular remodeling in hypertension, induces the inactivation/oxidation of PTPs in VSMCs. We also evaluated whether this inactivation alters growth signaling in hypertension. Our results demonstrate that ROS increases vascular $[Ca^{2+}]_i$ and contraction, primarily via extracellular Ca^{2+} influx. Whereas responses to H_2O_2 are enhanced, $^{\bullet}O_2^-$ -mediated actions are blunted in SHR. These effects may relate to differential activation of Ca^{2+} channels in SHR. Enhanced activation of L-type Ca^{2+} channels and increased Ca^{2+} influx by H_2O_2 may contribute to increased Ca^{2+} signaling in VSMCs from SHR. Furthermore, we demonstrate that H_2O_2 increases ERK1/2 and p38MAP kinase activation through tyrosine kinase-dependent, PKC-independent mechanisms. Whereas ERK1/2 is regulated by both receptor tyrosine kinases (RTK) and non-receptor tyrosine kinases (NRTK), p38MAP kinase is regulated by NRTKs. Our findings identify an important role for tyrosine kinases in H_2O_2 -induced phosphorylation of MAP kinases in VSMCs. Upregulation of these processes may contribute to enhanced redox-dependent MAP kinase signaling in SHR VSMCs. Finally, we show that Ang II increases phosphorylation of growth signaling kinases in SHR by oxidation/inactivation of upstream PTPs. In SHR, SHP-2 oxidative inactivation is increased and phosphorylation is reduced as compared to WKY. These events are associated with augmented AKT signaling. Our findings identify ROS as intracellular signaling molecules contributing to the vascular damage in hypertension.

Key words: Essential hypertension, reactive oxygen species, angiotensin II, calcium signaling, VSMCs growth, PTP oxidation.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières.....	ix
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION

CHAPITRE 1. HYPERTENSION ARTÉRIELLE

1.1 Épidémiologie.....	2
1.2 Causes de l'hypertension.....	2
1.2.1 Hypertension primaire (Hypertension Essentielle).....	2
1.2.2 Hypertension secondaire.....	3
1.3 Définition.....	4
1.3.1 Rôle du système Rénine -Angiotensine.....	4
1.3.2 Rôle des reins.....	10
1.3.3 Rôle du système nerveux autonome.....	11
1.4 Traitements de l'hypertension artérielle.....	12
1.5 Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle.....	16
1.5.1 Modèles génétiques.....	16
1.5.1.1 Modèles phénotypiques de l'hypertension.....	16
1.5.1.2 Modèles génotypiques de l'hypertension.....	18

1.5.2	Modèles non génétiques.....	19
1.5.2.1	Modèles induits de manière chirurgicale.....	19
1.5.2.2	L'hypertension induite de manière endocrine, métabolique ou par la diète.....	20

CHAPITRE 2. LE REMODELAGE VASCULAIRE EN HYPERTENSION ARTÉRIELLE

2.1	Les changements de structure des artères de résistance.....	22
2.1.1	Le remodelage eutrophique vs hypertrophique.....	22
2.1.2	Rôle de l'Ang II dans les changements de structure des artères de résistance en hypertension.....	25
2.1.2.1	La signalisation intracellulaire induite par l'Ang II dans les CMLVs.....	25
2.1.2.2	La croissance cellulaire induite par l'angiotensine II.....	31
2.1.3	Le remodelage de la matrice extracellulaire.....	35
2.1.4	Inflammation vasculaire.....	36
2.2	Changements de fonction des artères de résistance.....	37

CHAPITRE 3. LES DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE, LES MODIFICATIONS DES PROTÉINES ET LE SYSTEME VASCULAIRE

3.1	Le système oxydant.....	40
3.2	Le système anti-oxydant.....	44
3.3	Modification des protéines par le stress oxydatif.....	45
3.3.1	Modification des protéines par l'oxydation des résidus cystéines	45

3.3.2	Formation d'un pont disulfide intra- moléculaire.....	45
3.3.3	Dimérisation des protéines par la formation d'un pont inter- moléculaire.....	46
3.3.4	Formation d'un pont dityrosine.....	46
3.3.5	Oxydation des protéines par les métaux (Chimie Fenton).....	46
3.4	Cibles moléculaires des DROs dans la vasculature.....	47
3.4.1	Calcium intracellulaire	47
3.4.2	MAP (mitogen-activated protein) kinases.....	48
3.4.3	Protéines tyrosines kinases.....	51
3.4.4	Protéines tyrosines phosphatases.....	52
3.4.5	Facteurs de transcription.....	55
3.4.6	Les protéines du cycle cellulaire.....	55
3.5	Régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose par les DROs	56
3.6	Dommmages vasculaires induits par les DROs.....	58
 CHAPITRE 4. LES DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE ET L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE		
4.1	Le stress oxydant dans les modèles génétiques d'hypertension.....	60
4.2	Le stress oxydant dans les modèles expérimentaux d'hypertension.....	61
4.3	Le stress oxydant dans l'hypertension humaine.....	62
4.4	Stratégies pour réduire le stress oxydant en hypertension artérielle.....	63
 OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....		66

DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES ARTICLES

CHAPITRE 5: Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats.....	69
5.1 ABSTRACT.....	71
5.2 INTRODUCTION.....	73
5.3 METHODS.....	76
5.4 RESULTS.....	81
5.5 DISCUSSION.....	84
5.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	88
5.7 REFERENCES.....	89
5.8 LEGENDS TO FIGURES.....	97
5.9 FIGURES.....	100
CHAPITRE 6: Mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide is mediated through tyrosine kinase-dependent, protein kinase C-independent pathways in vascular Smooth Muscle Cells –Upregulation in spontaneously hypertensive rats.....	109
6.1 ABSTRACT.....	111
6.2 INTRODUCTION.....	113
6.3 METHODS.....	115
6.4 RESULTS.....	118
6.5 DISCUSSION.....	120
6.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	124

6.7 REFERENCES.....	125
6.8 LEDENDS TO FIGURES.....	131
6.9 FIGURES.....	133

CHAPITRE 7: Redox-sensitive vascular smooth muscle cell growth by angiotensin II involves oxidation of protein tyrosine phosphatase SHP-2 – dysregulation in hypertension.....	139
---	------------

7.1 ABSTRACT.....	141
7.2 INTRODUCTION.....	142
7.3 METHODS.....	144
7.4 RESULTS.....	148
7.5 DISCUSSION.....	151
7.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	155
7.7 REFERENCES.....	156
7.8 LEDENDS TO FIGURES.....	163
7.9 FIGURES.....	165

TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION, CONCLUSION,

BIBIOLGRAPHIE ET ANNEXE

DISCUSSION.....	175
CONCLUSION.....	197
BIBLIOGRAPHIE.....	199
ANNEXE.....	232

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Mécanismes biochimiques menant à la production des peptides angiotensines.....	7
Figure 2.	Remodelage vasculaire des petites artères en hypertension artérielle....	24
Figure 3.	Signalisation intracellulaire induite par l'Ang II dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	30
Figure 4.	L'activation de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II dans cellules vasculaire.....	43
Figure 5.	La signalisation redox dans les cellules musculaires lisses vasculaires..	50
Figure 6.	Oxydation des protéines tyrosines phosphatases par les DROs.....	54
Figure 7.	Modification redox des protéines tyrosines phosphatases dans les cellules musculaires lisses vasculaire.....	191

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ang II	Angiotensine II
ACE	L'enzyme de conversion de l'angiotensine
AP-1	Activator protein 1
[Ca ²⁺]	Concentration de calcium intracellulaire
CDKs	Kinases dépendantes des cyclines
CMLVs	Cellules musculaires lisses vasculaires
DAG	Diacylglycérole
DPI	Diphenyleneiodonium chloride
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
EC	Cellule endothéliale
EGF	Facteur de croissance épidermal
EGF-R	Récepteur du facteur de croissance épidermal
FAK	Focal adhesion kinase
GPX	Glutathione peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HVA	High voltage-activated
IGF-1R	Récepteur du facteur de croissance de type insuline
InsP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
JAK	Janus family kinases
LVA	Low voltage-activated
MAP kinases	Mitogen-activated proteins kinases
MMP	Métalloprotéinase de la matrice
NAD(P)H oxydase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase
NF-κB	Facteur nucléaire κB
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
Nox	NAD(P)H oxydase

NoxA1	Nox Activator 1
NoxO1	Nox Organizer 1
NRTK	Tyrosines kinases de type non-récepteur
$\bullet\text{O}_2^-$	Anion superoxyde
ONOO-	Peroxynitrite
PDGF	Facteur de croissance plaquettaire
PDGF-R	Récepteur du facteur de croissance plaquettaire
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
Pyk 2	Ca ²⁺ -dependent proline-rich tyrosine kinase 2
RAS	Système rénine angiotensine
Redox	Oxydation/réduction
RTK	Tyrosines kinases de type récepteur
SERCA	Pompe Ca ²⁺ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique
Shc	"Src homology complexe"
SHP-2	Protéine tyrosine phosphatase 2
SOD	Superoxyde dismutase
STAT	Transducteur de signal et activateur de la transcription
TNF α	Tumor necrosis factor
XO/HX	Xanthine oxydase/hypoxanthine

DÉDICACE

À mes chers parents Beramtane Tabet et Houria Halfaoui

À mon adorable famille

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier de tout mon cœur mon directeur de recherche Dr Rhian Touyz. Vous êtes une directrice de recherche extraordinaire, dévouée et extrêmement talentueuse. J'aimerais vous remercier pour l'excellente formation scientifique que vous m'avez donné durant toutes ces années passées dans votre laboratoire. Vous m'avez inspiré avec votre talent, votre compétence, votre générosité et votre gentillesse. Rhian, vous avez été d'un grand support et vous m'avez offert de grandes opportunités et je vous en remercie. J'aimerais remercier mon co-directeur, Dr Ernesto L. Schiffrin, pour son soutien et son aide. J'aimerais vous remercier de m'avoir appris la rigueur et la persévérance scientifique. J'ai énormément apprécié vos commentaires et vos interventions pertinentes. C'était un grand honneur pour moi de faire mon Ph.D. sous la direction de deux chercheurs extrêmement compétents et reconnus mondialement dans le domaine de l'hypertension artérielle et des maladies cardiovasculaires.

J'aimerais remercier mes collègues et amis qui ont été pour moi des individus d'une générosité extrême. Ces années passées avec vous ont été merveilleuses. Merci pour votre aide et support.

Mon adorable famille, je vous aime tant et j'aimerais vous dire que sans vous rien de cela ne serait possible. Merci de m'avoir accompagné de manière enthousiaste dans chacune des étapes de mes études. Papa et maman, merci pour tous les sacrifices que vous avez faits pour nous et pour notre éducation.

À mes amis, je vous dis merci d'avoir été là pour moi et je suis très contente de savoir que vous serez toujours présents dans ma vie.

J'aimerais remercier les organismes subventionnaires : les Instituts en Recherche en Santé du Canada et Rx&D, la Société Québécoise de l'hypertension artérielle, la Société Canadienne de l'Hypertension Artérielle et le département de Pharmacologie pour leur support financier.

J'aimerais remercier le Département de Pharmacologie et le Dr René Cardinal de m'avoir admis au département. J'ai trouvé le programme de Ph.D. du Département de Pharmacologie extrêmement intéressant et stimulant.

Merci aux membres du Jury d'avoir accepté de siéger sur mon comité de mémoire et d'avoir consacré tant de temps et d'énergie pour l'évaluation de la thèse.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. HYPERTENSION ARTÉRIELLE

1.1 Épidémiologie

L'hypertension artérielle constitue une condition médicale chronique qui affecte environ un quart de la population Nord Américaine et demeure un énorme facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires, incluant les accidents cérébraux vasculaires, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale chronique et les maladies vasculaires périphériques (Chockalingam A *et al.* 2006).

1.2 Causes de l'hypertension

L'hypertension artérielle, de manière théorique, peut résulter d'une augmentation du débit cardiaque et/ou d'une augmentation de la résistance vasculaire périphérique (opposition offerte par les vaisseaux sanguins à la circulation sanguine). Plusieurs facteurs de risque prédisposent à l'hypertension artérielle. Il s'agit de facteurs individuels tels que l'âge et le sexe, de facteurs environnementaux tels que la consommation élevée de sodium, d'alcool et de tabac; ou encore le stress et le manque d'exercice. Finalement, d'autres facteurs tels que l'obésité ou le diabète peuvent également contribuer à la survenue de l'hypertension artérielle chronique.

1.2.1 Hypertension primaire (Hypertension Essentielle)

Dans près de 90 à 95 % des cas, l'hypertension est dite essentielle/primaire ou idiopathique, c'est-à-dire que les causes précises de la survenue de l'hypertension ne sont pas connues. Dans ce cas, les facteurs génétiques jouent probablement un rôle

très important. Chez l'être humain, l'hypertension essentielle constitue un trait complexe, plurifactoriel et quantitatif sous contrôle polygénique. Elle est associée à une augmentation de la résistance vasculaire périphérique principalement due à une réduction du diamètre de la lumière des petites artères et artérioles de résistance. Puisque la résistance est inversement proportionnelle au radius à la puissance quatre, des petites modifications du diamètre peuvent avoir un impact significatif sur la résistance vasculaire. Les petites artères et artérioles de résistance subissent des changements de structure et de fonction en hypertension artérielle. Parmi ces changements, la dysfonction endothéliale, l'augmentation de la réactivité vasculaire, la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs), la déposition de la matrice extracellulaire et l'inflammation semblent contribuer de manière très significative aux dommages vasculaires observés en hypertension artérielle (Schiffrin EL, 2004).

1.2.2 Hypertension secondaire

L'hypertension dite secondaire, qui constitue 5 à 10% de tous les cas d'hypertension, survient suite à une cause/pathologie connue incluant les maladies rénales (insuffisance rénale), les troubles endocriniens (aldostéronisme primaire) ou vasculaires (athérosclérose). L'origine de l'hypertension secondaire est dans la majorité des cas rénaux (sténoses artérielles rénales, maladies rénales chroniques) et de manière moins fréquente endocrinienne.

1.3 Définition

L'hypertension artérielle se définit par une augmentation de la pression artérielle de manière chronique. La pression artérielle moyenne est déterminée par le débit cardiaque et la résistance périphérique totale. Cette pression est obtenue par la mesure de deux données. La première donnée, la plus haute, appelée pression systolique a lieu lorsque le cœur exerce sa force maximale de contraction, la systole. La deuxième donnée, la plus basse, appelée pression sanguine diastolique constitue la phase de relaxation/dilatation du cœur et durant laquelle le cœur se remplit de sang, la diastole. Ces données sont mesurées en millimètres de mercure. Une pression artérielle est considérée normale lorsqu'elle est inférieure à 120/80; une pression se situant entre 120/80 et 139/89 se dit pré-hypertensive et une pression égale ou supérieure à 140/90 est considérée élevée.

La régulation de la pression artérielle chez l'humain dépend de plusieurs systèmes. Dans ce chapitre, nous allons discuter de la contribution du système rénine-angiotensine, du système rénal et du système nerveux autonome dans la régulation de la pression artérielle.

1.3.1 Rôle du système Rénine -Angiotensine

Le système rénine-angiotensine (RAS) joue un rôle important dans les réponses physiologiques et pathophysiologiques du système cardiovasculaire. L'activité normale de ce RAS est impliquée dans le maintien de la pression artérielle, la balance des électrolytes ainsi que dans la croissance et différenciation cellulaire. L'activité anormale du système rénine-angiotensine est associée à la pathophysiologie de

maladies cardiovasculaires tels que l'hypertension artérielle, la crise cardiaque et l'infarctus du myocarde (Nicholls MG *et al.* 1998).

L'angiotensinogène, l'angiotensine I et l'angiotensine II (Ang II) sont des peptides impliqués dans le maintien du volume sanguin et de la pression artérielle. Ces peptides jouent un rôle important dans le RAS. Ce système consiste en une cascade enzymatique aboutissant à la production d'Ang II, peptide vasoactif qui contribue à plusieurs des dommages vasculaires observés en hypertension artérielle (Figure 1). Ces dommages incluent la génération des dérivés réactifs de l'oxygène (DROs) qui contribuent de manière significative au remodelage vasculaire (voir ci-dessous) observé en hypertension artérielle (Intengan HD *et al.* 2001).

L'Ang II est un octapeptide produit systémiquement via le RAS classique ou rénal, ou localement via le RAS tissulaire. La rénine est synthétisée et stockée par les cellules juxtaglomérulaires de l'artériole afférente du glomérule rénal et est libérée, en réponse à certains stimuli, dans la circulation sanguine. La rénine exerce ses actions en se fixant sur les tissus tels que le foie, le cœur et les vaisseaux sanguins. Sa demi-vie plasmatique est de 15 à 30 minutes. La synthèse de rénine s'effectue en réponse à la baisse de la pression de perfusion sanguine, à une hypokaliémie et à une hyponatrémie. Dans la voie classique de production de l'Ang II, la rénine circulante synthétisée clive l'angiotensinogène, produit par le foie, pour former le décapeptide angiotensine I. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est responsable de la transformation de l'angiotensine I inactif en Ang II actif. Plusieurs des composantes du RAS sont localisées dans les tissus. L'ACE existe dans le plasma (hormone circulante), dans le milieu interstitiel et dans le milieu intracellulaire. L'ACE tissulaire est présente dans tous les organes y compris les vaisseaux sanguins, le cœur, le

cerveau, les reins, le foie et les poumons. L'ACE agit également sur le système kallikréine/kinine en inactivant la bradykinine (peptide vasodilatateur) (Jandeleit-dahm K *et al.* 2006).

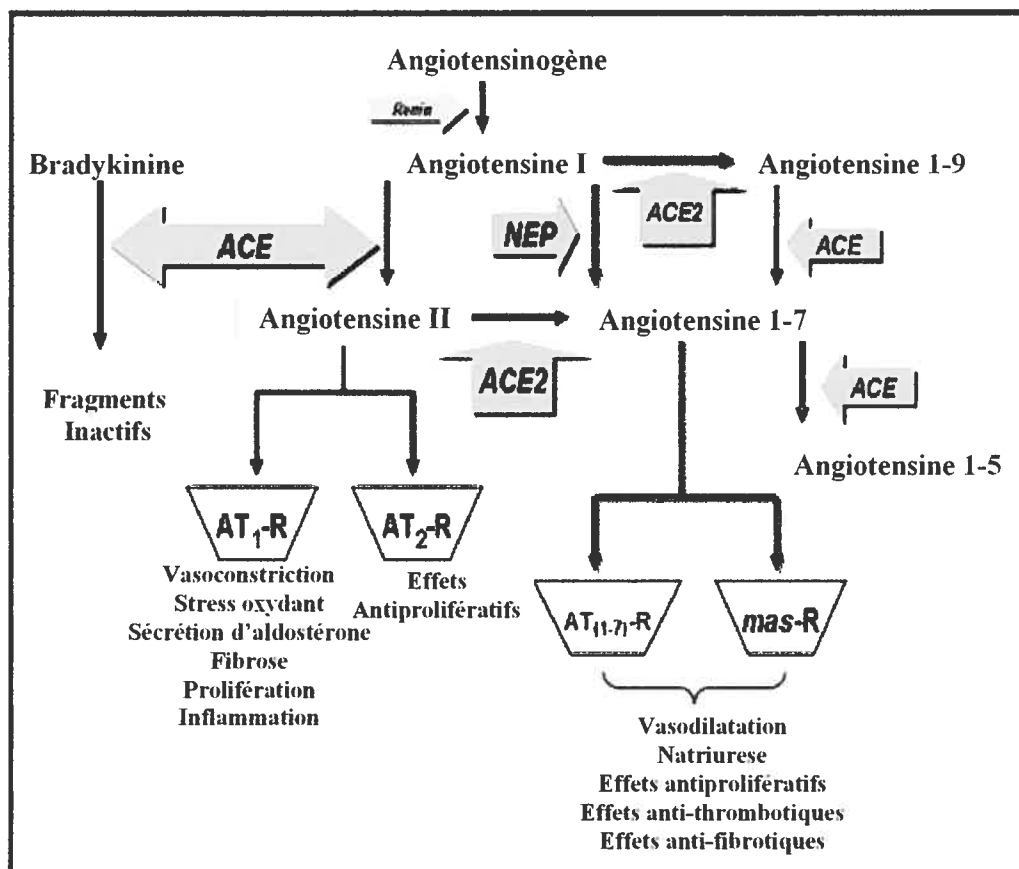


Figure 1. Mécanismes biochimiques menant à la production des peptides Angiotensines. AT-R= récepteur à l'angiotensine mas-R= récepteur mas (récepteur de l'Angiotensine 1-7)
Adapté de Ferrario CM *et al.* *Am J Cardiol.* 2006

L'Ang II interagit avec ses cellules cibles *via* des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (AT-1 et AT-2) (Weir MR *et al.* 1999). Via le récepteur AT-1, l'Ang II favorise l'augmentation de la pression artérielle par différents mécanismes : elle induit une vasoconstriction des artérioles, ce qui provoque une augmentation de la résistance vasculaire périphérique. De plus, l'Ang II induit la croissance cellulaire, augmente l'inflammation au niveau des vaisseaux sanguins (Intengan HD *et al.* 2001) et stimule la sécrétion d'aldostérone (hormone sécrétée par les glandes surrénales), ce qui provoque une augmentation de la volémie par réabsorption de sodium et d'eau au niveau des tubules proximaux des reins. De plus, l'Ang II stimule la sécrétion de la vasopressine (aussi appelée hormone anti-diurétique) qui limite la perte d'eau dans les urines et stimule la soif en induisant une plus grande absorption d'eau. D'un autre côté, à travers le récepteur AT-2, l'Ang II semble induire des effets opposés à ceux observés suite à la stimulation du récepteur AT-1 (Carey RM, 2005). En effet, l'Ang II, à travers la stimulation de son récepteur AT-2 induit une vasodilatation et une inhibition de la croissance cellulaire (Gallinat S *et al.* 2000).

Depuis une dizaine d'années, il a été démontré que d'autres peptides, formés dans la cascade enzymatique du système RAS, pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de la fonction cardiovasculaire. Parmi ces peptides, il a été démontré que l'heptapeptide Ang 1-7 antagonisait plusieurs des effets cardiovasculaires de l'Ang II (Ferrario CM, 1998). L'Ang 1-7 exerce ses actions au niveau des vaisseaux sanguins, des reins et du cerveau. Ces actions incluent la vasodilatation (augmentation de la libération de NO), l'amélioration de la fonction vasculaire et l'inhibition de la prolifération des CMLVs (Ferreira AJ *et al.* 2005). Au niveau du cerveau, l'Ang 1-7

stimule la libération de vasopressine et facilite les baroreflexes. Dans les reins, l'Ang 1-7 possède des effets diurétiques et natriurétiques en plus d'inhiber le transport de sodium et de bicarbonate. Les effets cellulaires de l'Ang 1-7 incluent la stimulation de la libération de prostaglandine E₂ et l'augmentation des actions vasodilatatrices de la bradykinine (Ferrario CM, 1998). L'Ang 1-7 peut être générée, à la fois à partir d'Ang I et d'Ang II, par l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE 2), ce qui réduit les niveaux d'Ang II et augmente les niveaux d'Ang 1-7. Ainsi, la balance entre l'ACE et l'ACE2 est un facteur important dans le contrôle des niveaux d'Ang II ainsi que dans le contrôle des actions de ce dernier au niveau du système cardiovasculaire (Danilczyk U *et al.* 2006). Plusieurs évidences suggèrent que l'ACE 2 diminue la progression des maladies cardiovasculaires. En effet, les souris déficientes en ACE 2 démontent une dysfonction de la fonction cardiaque (Crackower MA *et al.* 2002). De plus, une association étroite entre l'ACE 2 et l'hypertension artérielle a été suggérée. L'ACE 2 est exprimée au niveau de l'aorte et des reins des rats spontanément hypertendus (SHR) et il a été démontré dans une récente étude que le blocage soutenu des récepteurs AT-1 avec l'olmesartan entraîne l'augmentation subséquente des niveaux aortiques de l'ACE 2 chez le rat SHR contribuant à l'inhibition du remodelage vasculaire en hypertension artérielle (Igase M *et al.* 2005).

1.3.2 Rôle des reins

La régulation à long terme de la pression artérielle moyenne est associée à l'homéostasie du volume du fluide extracellulaire qui est elle-même déterminée par le contenu en sodium. La balance du sodium est déterminante pour le volume du fluide extracellulaire et les reins sont importants puisqu'ils constituent la voie principale à travers laquelle le sodium est éliminé. Ainsi, l'augmentation de la pression artérielle moyenne ou l'augmentation de la pression de perfusion du rein est associée à une augmentation à la fois de l'excrétion rénale de sodium et de la pression de natriurèse. Ces événements induisent une diminution du volume du fluide extracellulaire et une diminution du débit cardiaque, ce qui rétablit la pression artérielle moyenne à la normale (Guyton AC *et al.* 1972). La fonction rénale peut être modifiée par des facteurs endocriniens et neuronaux et plus particulièrement par le RAS.

L'hypertension artérielle peut être une conséquence d'une régulation anormale de la pression natriurétique ce qui entraîne le sacrifice de la pression artérielle dans le but de préserver la balance du sodium. Dans plusieurs modèles de l'hypertension artérielle, la dysfonction de la fonction rénale est reliée à plusieurs changements de structures du rein incluant une sténose des artères rénales et une perte de la masse rénale. Ces changements bloquent l'excrétion adéquate de sodium par le rein et augmentent le risque du développement de l'hypertension artérielle (Mullins LJ *et al.* 2006).

1.3.3 Rôle du système nerveux autonome

La pression artérielle est une fonction de la résistance vasculaire et du débit cardiaque, deux variables contrôlées par le système nerveux autonome. Ce dernier est divisé en deux: le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique. Ces deux systèmes sont différenciés par le neurotransmetteur post-ganglionnaire libéré lors d'une stimulation: la noradrénaline dans le cas du système sympathique et l'acétylcholine pour le système parasympathique. Beaucoup d'organes sont innervés par le système sympathique et parasympathique y compris les vaisseaux sanguins et donc les CMLVs. L'activation du système sympathique induit une augmentation de la pression artérielle soit par l'augmentation de la résistance périphérique ou par l'augmentation du débit cardiaque. La noradrénaline libérée au niveau des fibres post-ganglionnaires sympathiques peut agir sur des récepteurs α -adrénergiques des CMLVs et provoquer une vasoconstriction des vaisseaux ou sur les récepteurs β -adrénergiques du cœur induisant ainsi un effet chronotrope (fréquence cardiaque) et inotrope positif (force). L'activation du système nerveux parasympathique induit l'effet inverse, soit une vasodilatation et une diminution de la pression artérielle principalement suite à une diminution du débit cardiaque.

L'activation du SNS est impliquée dans la pathophysiologie de l'hypertension artérielle via les effets trophiques de la norépinephrine (NE) sur la vasoconstriction, le remodelage vasculaire et la compliance artérielle (Guyenet PG, 2006). Bien que la majorité des effets de l'Ang II sur la pression artérielle sont dus à des effets directs du peptide sur le système vasculaire, quelques observations ont démontré que le SNS pourrait avoir un rôle à jouer dans ce processus. En effet, dans des études effectuées sur le chien, le blocage pharmacologique des récepteurs α -adrénergiques

(phentolamine) à réduire les effets de l'Ang II sur la pression artérielle (Cline WH, 1981).

1.4 Traitements de l'hypertension artérielle

Plusieurs thérapies anti-hypertensives sont présentement utilisées en clinique pour diminuer la hausse de la pression artérielle mais également pour prévenir les risques de développement des complications cardiovasculaires liées à l'hypertension artérielle. Considérant la complexité de la maladie et plus particulièrement la composante multifactorielle et génétique de cette pathologie, la combinaison de plusieurs médicaments ainsi que des approches non-pharmacologiques s'avèrent nécessaires pour contrôler l'hypertension artérielle chez certains patients.

Les agents pharmacologiques utilisés dans le traitement de l'hypertension incluent : 1- les antagonistes des canaux calciques qui agissent au niveau du cœur et des artères en réduisant l'influx de calcium au niveau des cellules musculaires lisses induisant ainsi une vasodilatation coronaire et périphérique. 2- Les antagonistes du récepteur AT-1. 3- Les vasodilatateurs périphériques tel que l'hydralazine, diminuent la pression artérielle sanguine suite à la dilatation des vaisseaux périphériques. La dilatation des artères déclenche une activation du SNS médiée par les barorécepteurs. 4- Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (captopril) agissent en inhibant la production d'Ang II. La diminution d'Ang II circulante induit une diminution des effets cardiovasculaires du peptide et une réduction subséquente de la tension artérielle. 5- Les bloqueurs β -adrénergiques antagonisent les effets du système nerveux sympathique. Ils diminuent la fréquence, la contractilité ainsi que le débit

cardiaque. Les bloqueurs β -adrénergiques diminuent également la production de rénine par le rein. 6- Les diurétiques agissent en inhibant la réabsorption du sodium à différents niveaux du néphron. Ils incluent les diurétiques de l'anse (furosémide) qui inhibent la réabsorption de sodium et de chlore au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé; les diurétiques thiazidiques (hydrochlorothiazide) qui agissent au niveau de la portion initiale du tube distal en inhibant la réabsorption de chlorure de sodium; et les anti-aldostérone (spironolactone) qui diminuent l'absorption de sodium et la sécrétion de potassium au niveau de la portion terminale du tube distal et du tube collecteur. 7- Le sodium nitroprusside est un médicament anti-hypertenseur utilisé dans les cas d'urgences. Il agit en dilatant les artères et veines périphériques suite à une activation de la guanylate cyclase via la libération de NO à partir du sodium nitroprusside.

Trois différentes classes de bloqueurs des canaux calciques sont utilisées en clinique: les dihydropyridines (nifedipine), les phénylalkamines (verapamil) et les benzothiazépines (diltiazem). Le mibefradil fait partis de la classe des « benzimidazoles-substituted tetralines », mais n'est plus utilisé en clinique. Les bloqueurs des canaux calciques de type L lient la sous-unité α_1 , qui constitue le port du canal, au niveau de différents sites. Tandis que le verapamil lie le segment 6 du motif 4 de la sous-unité α_1 , le diltiazem lie le pont entre le motif 3 et le motif 4 de la sous-unité α_1 . Le mibefradil lie également la sous-unité α mais est spécifique aux canaux calciques de type T. Tous les bloqueurs des canaux calciques diminuent la résistance vasculaire coronaire et augmentent le flot sanguin coronaire. La diminution de la résistance périphérique vasculaire s'effectue via la vasodilatation des artérioles. Les bloqueurs des canaux calciques ne possèdent pas un effet

significatif sur le tonus veineux (Richard S *et al.* 2005). En plus d'induire une vasodilatation, le verapamil a des effets chronotropes et inotropes négatifs. L'effet chronotrope négatif est capable de surpasser le réflexe sympathique induisant ainsi une diminution de la fréquence cardiaque. L'effet inotropique négatif surpasse le réflexe sympathique et résulte en une diminution de la contractilité du myocarde. Le diltiazem, par contre, cause une réduction modeste de la fréquence cardiaque et de la contractilité du myocarde. Les effets inotropes négatifs induits par le verapamil et le diltiazem sont dus à la diminution de l'influx du calcium pendant la phase plateau du potentiel d'action. Le mibefradil est un vasodilatateur périphérique et coronaire dont les effets sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque sont comparables à ceux du verapamil et diltiazem. Cependant, les effets inotropes négatifs induits par le mibefradil sont modestes comparativement à ceux du verapamil et diltiazem. Ceci s'explique par le fait que des canaux ioniques de type T sont peu exprimés au niveau du ventricule (Richard S *et al.* 2005). En plus de tous les effets cardiovasculaires induits par les bloqueurs des canaux calciques, il a été démontré que ces derniers ont des effets antioxydants importants. Ces effets sont expliqués par l'augmentation de la libération de NO (Berkels R *et al.* 2001; Godfraind T, 2005). L'augmentation de la biodisponibilité du NO pourrait contribuer aux effets antihypertenseurs induits par les inhibiteurs des canaux calciques (Schulman IH *et al.* 2005).

Les antagonistes du récepteur AT-1, également connus sous le nom de bloqueurs AT-1, sont des agents thérapeutiques spécifiques qui inhibent le système rénine-angiotensine par un blocage sélectif des récepteurs AT-1 de l'Ang II. Les antagonistes des récepteurs AT-1 sont principalement utilisés dans le traitement de l'hypertension

artérielle mais également dans le traitement de la néphropathie et de l'insuffisance cardiaque (Latini R *et al.* 2004). Le blocage des récepteurs AT-1 cause une vasodilatation artérielle, une réduction de la sécrétion de vasopressine, une réduction de la production et de la sécrétion d'aldostérone, mais également une réduction de la production de DROs. Tous ces effets induisent une réduction de la pression artérielle. Actuellement, six antagonistes des récepteurs AT-1 sont commercialisés au Canada pour le traitement de l'hypertension artérielle. Ceux-ci incluent le losartan, le valsartan, l'irbésartan, le candésartan, le telmisartan et l'éprosartan. Plusieurs études ont évalué l'efficacité antihypertensive des inhibiteurs des récepteurs AT-1 chez les patients atteints d'hypertension modérée ou grave (Tikkanen I *et al.* 1995; Weber MA *et al.* 1997; Weber M, 1999, Kassler-Taub K *et al.* 1998). Les inhibiteurs des récepteurs de l'Ang II induisent une baisse similaire de la tension artérielle chez les jeunes et les personnes âgées ainsi que les hommes et les femmes. Lorsqu'on les administre en monothérapie, les inhibiteurs des récepteurs AT-1 sont moins efficaces à réduire la tension artérielle chez les noirs, mais leur effet antihypertenseur est nettement potentialisé par l'ajout d'un diurétique.

Considérant, le remodelage vasculaire en hypertension artérielle dite essentielle, plusieurs études ont démontré que les inhibiteurs de ACE, les bloqueurs des récepteurs AT-1 et les bloqueurs des canaux calciques, corrigent par leurs effets anti-hypertenseurs, le remodelage des petites artères chez les patients hypertendus (Schiffrin EL, 2004).

1.5 Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle

1.5.1 Modèles génétiques

Le type d'hypertension le plus commun chez l'humain est l'hypertension essentielle qui est caractérisée par une contribution génétique importante. Plusieurs gènes ont été étudiés dans le but de décrire et d'expliquer leurs contributions spécifiques dans le développement de l'hypertension essentielle.

1.5.1.1 Modèles phénotypiques de l'hypertension

Les modèles génétiques basés sur le phénotype de l'hypertension sont communément utilisés dans la recherche car ils ont le potentiel d'explorer l'hypertension polygénique. Deux modèles de rats sont couramment utilisés pour étudier l'hypertension artérielle dans son caractère polygénique. Il s'agit des modèles SHR (rat spontanément hypertendu) et SHR-SP (rat spontanément hypertendu –stroke prone) (Okamoto K *et al.* 1963; Okamoto K *et al.* 1986). Le développement de la lignée de rats hypertendus homozygotes SHR est réalisé à partir de la reproduction d'un stock de rats non-consanguins spontanément hypertendus Wistar Kyoto (WKY). La reproduction est effectuée pendant 20 générations sélectives et successives, jusqu'à l'atteinte de l'homogénéité génétique de l'espèce. La variation individuelle dans le "background" génétique des rats SHR influence le développement de l'hypertension ainsi que les dommages cardiovasculaires observés. La tension artérielle chez les nouveaux nés SHR est normale, ce n'est qu'entre la 3ème et la 10ème semaine de vie que la tension artérielle commence à augmenter chez le rat SHR (Clubb FJ Jr *et al.* 1987). À l'âge de 16 semaines, l'hypertension artérielle dans ce modèle SHR est bien

établie et la pression systolique atteint un plateau à 180-200 mm Hg. Le rat SHR constitue donc un bon modèle pour étudier l'hypertension essentielle chez l'humain. Plusieurs gènes sont impliqués dans le développement de l'hypertension dans cette espèce et un gène additionnel situé sur le chromosome 10 contribue au développement et au maintien de l'hypertension chez le SHR adulte. Des analyses effectuées sur ce modèle ont démontré l'importance de la génétique dans l'hypertension expérimentale. Ainsi, on estime qu'environ 60% de la variance de la pression artérielle est héréditaire (Yamori Y, 1999). Le SHR, est associé à une augmentation de l'activité sympathique rénale et cardiaque, deux organes qui jouent un rôle primordial dans le maintien et le développement de la pression artérielle. L'étiologie à l'origine du développement de l'hypertension chez le SHR est associée à une augmentation de la résistance vasculaire périphérique totale mais le débit cardiaque reste normal jusqu'à ce que la fonction du myocarde est altérée (Frohlich *et al.* 1971). Le développement de la résistance périphérique totale affecte tous le système vasculaire même si les plus grands changements de la résistance périphériques affectent les petites artères et artérioles de résistance. En plus de l'augmentation de l'activité sympathique et de la résistance périphérique vasculaire, ce modèle développe une dépression de la vasodilatation induite par l'endothélium. De plus, plusieurs dommages du système cardiovasculaire liés à l'hypertension artérielle sont observés; ceux-ci comprennent l'hypertrophie cardiaque, l'insuffisance cardiaque et la dysfonction rénale. Cependant, ce modèle de rat n'a pas de tendance à développer des crises cardiaques, de l'athérosclérose ou de la thrombose vasculaire (Feld LB *et al.* 1977; Pfeffer JM *et al.* 1979). En plus du rat SHR, certains modèles de rats tels que le rat Dahl sensible au sel a été développé en utilisant la même méthode. Ce modèle mime l'hypertension

artérielle chez les individus ayant une sensibilité au sodium (Yagil C *et al.* 2003). En pratique clinique, l'hypertension artérielle s'accompagne de certaines morbidités telles que le diabète de type II et l'obésité. Plusieurs modèles de rats tels que le modèle de rat Sprague Dawley nourri avec une diète riche en gras (Dobrian AD *et al.* 2003), le modèle Zucker obèse (Alonso-Galicia M *et al.* 1996) et le rat Wistar obèse (Imai G *et al.* 2003) sont utilisés pour étudier l'interaction entre le diabète, l'hypertension et l'obésité.

Dans la majorité de ces modèles, l'hypertension est associée à une hypertrophie cardiaque, une dysfonction endothéliale et une dysfonction rénale (protéinurie, diminution de la clairance de la créatinine) (Pinto YM *et al.* 1998).

1.5.1.2 Modèles génotypiques de l'hypertension

La fonction des gènes en hypertension artérielle est étudiée en utilisant des modèles transgéniques où l'expression d'un gène est augmentée et des "knock-out" où l'expression du gène étudié est supprimée. Dans ce sens, des modèles de souris sur-exprimant ou sous-exprimant des composants du système RAS (AT-1, ACE, angiotensinogène), récepteurs à l'endothéline (ET-A, ET-B), monoxyde d'azote synthase (NOS endothéliale, neuronale et inductible), récepteur β -adrénergique et rénine ont été générés dans le but d'étudier la contribution de ces gènes en hypertension artérielle (Lerman LO *et al.* 2005). Le polymorphisme génétique du récepteur AT-1 a démontré l'importance de ce gène dans l'hypertension essentielle et son rôle dans les dommages vasculaires liés à cette pathophysiologie (Mettimano M *et al.* 2002). De plus, il a été démontré que la surexpression du récepteur AT-1 induit une hypertension artérielle accompagnée d'une hypertrophie cardiaque et d'une

augmentation de la réponse contractile du coeur à l'Ang II (Hoffmann S *et al.* 2001). De plus, la surexpression du récepteur AT-2 induit une vasodilatation, suite à la production de la bradykinine, NO et guanosine monophosphate cyclique, ainsi qu'une atténuation du remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde (Tsutsumi Y *et al.* 1999; Yang Z *et al.* 2002).

1.5.2 Modèles non-génétiques

Plusieurs approches expérimentales, non- génétiques, ont mené au développement de modèles qui permettent d'étudier l'effet de l'hypertension sur les dommages cardiovasculaires.

1.5.2.1 Modèles induits de manière chirurgicale

La constriction uni- latérale de l'artère rénale (Two-Kidneys, one-clip; 2K-1C) chez les rats (Leenen FH *et al.* 1971) et souris (Wiesel P *et al.* 1997) entraîne le développement graduel et chronique de l'hypertension artérielle. Les dommages cardiovasculaires du modèle 2K-1C incluent la dysfonction endothéliale, l'hypertrophie cardiaque et l'hypertrophie du rein controlatéral (Pinto YM *et al.* 1998). Les conséquences de la sténose artérielle rénale peuvent être exacerbées par une néphrectomie controlatérale. C'est ce qui se passe chez le modèle 1K-1C (one-Kidney, one-clip) qui mime de manière fiable l'hypertension artérielle secondaire (Thurston H *et al.* 1976).

1.5.2.2 L'hypertension induite de manière endocrine, métabolique ou par la diète

La méthode d'induction de l'hypertension de manière endocrine la plus communément utilisée introduite il y a déjà 60 ans, est l'administration de minéralocorticoïdes, particulièrement DOCA, chez l'animal. Chez certaines espèces (rats et chiens), l'hypertension survient après l'imposition d'une diète riche en sel ou une néphrectomie (Terris JM *et al.* 1976; Lawler JE *et al.* 1987). L'hypertension développée dans ce modèle est caractérisée par une expansion du volume sanguin et par conséquent une augmentation du débit du cœur, de l'hypertrophie cardiaque, de la dysfonction endothéliale, de la protéinurie et une glomérulosclérose (Pinto YM *et al.* 1998).

Les glucocorticoïdes peuvent également induire l'hypertension chez les souris et rats probablement via l'activation du système rénine -angiotensine (RAS) (Dahl LK *et al.* 1965). L'infusion chronique des composantes du système RAS, tel que l'Ang II, est également un excellent modèle d'induction de l'hypertension. En 1965, il a été démontré que l'infusion systémique chronique de l'Ang II induit une augmentation lente et progressive de la pression artérielle (McCubbin JW *et al.* 1965). Ce modèle se caractérise par le remodelage des petits vaisseaux ainsi que par une augmentation du stress oxydant (Reckelhoff JF *et al.* 2000). De plus, l'inhibition chronique de la production d'oxyde nitrique (NO) produit une augmentation de la pression artérielle dépendante du volume chez plusieurs espèces traitées (Lahera V *et al.* 1992; Salazar FJ *et al.* 1993). Les caractéristiques physiologiques et pathologiques de ce modèle ressemblent à l'hypertension essentielle chez l'humain (Romero JC *et al.* 1993).

L'hypertension expérimentale peut également être induite par des diètes spécifiques telles que les diètes riches en sodium. Les rats Dahl sont, en effet, caractérisés par une haute pression artérielle et une fréquence cardiaque diminuée même en présence de diètes relativement faibles en sodium. Ces rats présentent une rétention de sodium et d'eau augmentée, et une augmentation du volume sanguin et de l'activité du système nerveux sympathique (Somova LI *et al.* 1999). Finalement, une diète riche en fructose induit une hypertension artérielle et une résistance à l'insuline à la fois chez les rats Sprague-Dawley et Wistar Kyoto, et ce dû à la régulation à la baisse des récepteurs à l'insuline et à l'Ang II (Hwang IS *et al.* 1987; Catena C *et al.* 2003).

CHAPITRE 2. LE REMODELAGE VASCULAIRE EN HYPERTENSION ARTÉRIELLE

L'anomalie hémodynamique fondamentale à l'origine de l'hypertension artérielle est une augmentation de la résistance périphérique principalement due à des changements affectant la structure et la fonction vasculaire. Ces changements surviennent principalement au niveau des petites artères et des artéioles (100-350 μm de diamètre) connues sous le nom d'artères de résistance. Ces changements se manifestent par un remodelage des artères de résistance, une dysfonction endothéliale et par un tonus vasculaire anormal et ils découlent d'altérations biologiques affectant certaines composantes cellulaires et non cellulaires de la paroi artérielle. Le remodelage des artères de résistance pourrait entraîner des complications cardiovasculaires telles que l'hypertension (Schiffrin EL *et al.* 1992) mais aussi l'ischémie du myocarde (Hasdai D *et al.* 1997) et l'insuffisance rénale (Klahr S *et al.* 2003). Ce chapitre couvre les changements de structure et de fonction des artères de résistance en hypertension artérielle, et plus particulièrement le rôle que joue l'Ang II dans ces phénomènes.

2.1 Les changements de structure des artères de résistance

2.1.1 Le remodelage eutrophique vs hypertrophique

En hypertension artérielle, les artères de résistance subissent un remodelage hypertrophique et/ou eutrophique (Figure 2). Le remodelage eutrophique se définit par un réarrangement des cellules de la paroi vasculaire autour d'un diamètre interne

réduit sans qu'il y ait de changement de l'aire de section de la média. Le remodelage hypertrophique se caractérise par un épaissement de la paroi vasculaire et par une augmentation de l'aire de section de la média sans qu'il y ait de changement du diamètre interne de l'artère. L'hypertension chez les modèles de rats SHR et 2K-1C Goldblatt ainsi que l'hypertension essentielle légère chez l'humain se caractérise par un remodelage vasculaire eutrophique; tandis que l'hypertension humaine sévère et secondaire ou encore l'hypertension chez les modèles de rats DOCA-sel, 1K-1C Goldblatt ou Dahl sensibles au sel démontre un remodelage vasculaire hypertrophique. La croissance, l'inflammation, la fibrose et l'apoptose sont des mécanismes impliqués dans le remodelage vasculaire en hypertension (Intengan HD *et al.* 2001).

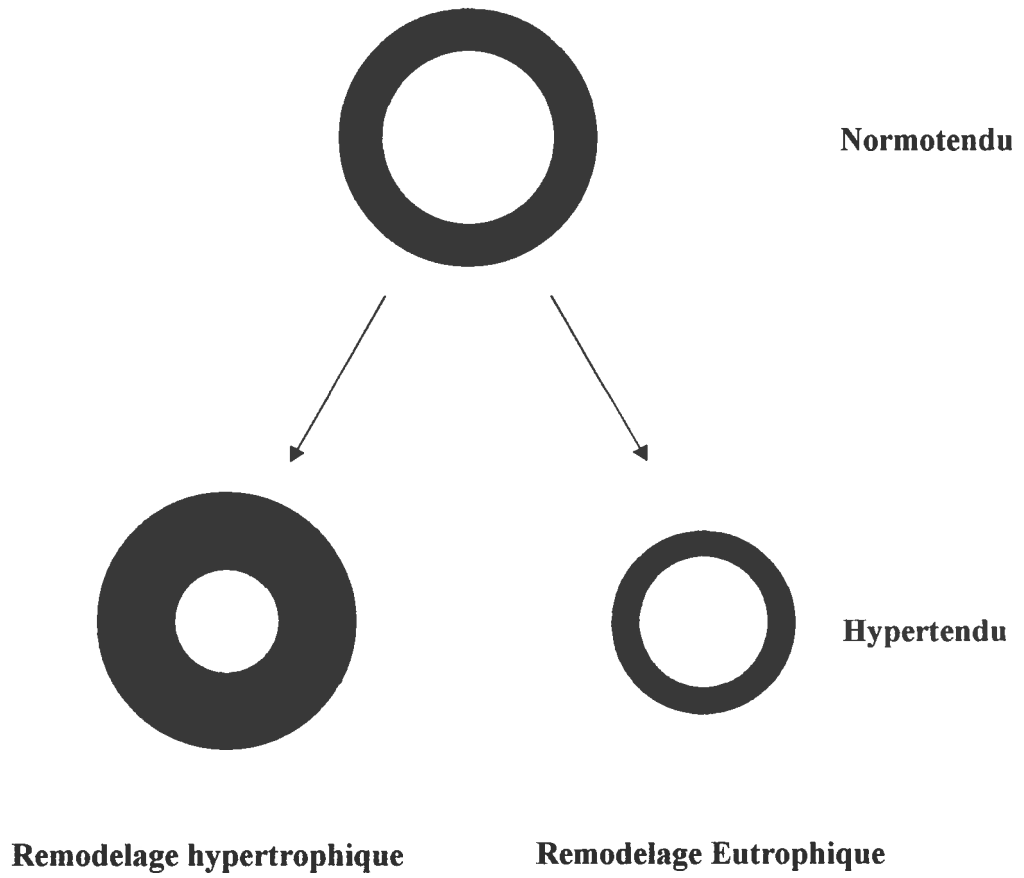


Figure 2. Remodelage vasculaire des petites artères en hypertension artérielle.
Adapté de Heagerty AM *et al.* *Hypertension* 1993

2.1.2 Rôle de l'Ang II dans les changements de structure des artères de résistance en hypertension

2.1.2.1 La signalisation intracellulaire induite par l'Ang II dans les CMLVs

Les CMLVs sont des cellules dynamiques et multifonctionnelles qui contribuent de manière significative au remodelage vasculaire à travers plusieurs processus tels que la croissance (hypertrophie et hyperplasie), l'apoptose, la différenciation et la réorganisation cellulaire (Berk BC *et al.* 2001). L'Ang II médie ses effets à travers des patrons de signalisation intracellulaires complexes. Ces signaux de transductions sont activés suite à la liaison de l'Ang II à un de ses récepteurs couplés aux protéines G AT-1 ou AT-2 (Touyz RM *et al.* 2000). Même si ces deux récepteurs ont des actions différentes, ils jouent un rôle important dans la régulation de la fonction des CMLVs.

La majorité des actions de l'Ang II sont médiées à travers le récepteur AT-1 qui est largement exprimé dans la majorité des organes incluant les vaisseaux sanguins, les reins, le cœur, le foie, le cerveau, les poumons et les surrénales. AT-1 est composé de 359 acides aminés et appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires. Chez le rat, deux isoformes du récepteur AT-1, partageant 95% d'homologies, ont été identifiés : AT-1A sur le chromosome 17 et AT-1B sur le chromosome 2. De manière fonctionnelle et pharmacologique, ces deux récepteurs sont équivalents (Gasc JM *et al.* 1994). Des études *in vivo* ont démontré que le récepteur AT-1A serait plus important que le récepteur AT-1B dans la régulation de la pression artérielle (Chen X *et al.* 1997). L'expression et l'activation

du récepteur AT-1 sont des mécanismes importants dans la régulation des actions de l'Ang II. De plus, l'augmentation aiguë du niveau d'Ang II induit une augmentation de l'activation du récepteur AT-1. Par contre, une infusion chronique de l'Ang II induit une régulation à la baisse de l'expression des récepteurs AT-1 (Lassegue B *et al.* 1995; Touyz RM *et al.* 1999a).

Un des effets aigüe de l'action de l'Ang II est la vasoconstriction médiée par l'activation du récepteur AT-1. La stimulation des CMLVs avec l'Ang II couple le récepteur AT-1 à la protéine G ($G_{\alpha_{q/11}}$, $G_{\alpha_{12/13}}$ et $G_{\beta\gamma}$), ce qui active une cascade de signalisation intracellulaire menant à la contraction des CMLVs. Les effecteurs actifs dans cette cascade incluent la phospholipase C (PLC), la phospholipase A₂ (PLA₂) et la phospholipase D (PLD) (Ushio-Fukai M *et al.* 1998a; Ushio-Fukai M *et al.* 1999a). L'activation de la PLC induit la production rapide d'inositol-1, 4, 5-triphosphate (InsP₃) et diacylglycérole (DAG). L'InsP₃ lie son récepteur au niveau du réticulum sarcoplasmique et induit ainsi l'ouverture des canaux InsP₃ dépendants et la libération subséquente du calcium (Ca²⁺) des stores intracellulaires vers le cytoplasme. Le Ca²⁺ libéré lie la calmoduline et active une kinase (myosin light chain kinases, MLCK) responsable de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, ce qui permet l'interaction entre l'actine et la myosine et la contraction subséquente des CMLVs. La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine est modulée par une protéine appelée RhoA/Rho kinase. Rho kinase a pour fonction d'inhiber la phosphatase de la chaîne légère de la myosine ce qui prolonge la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et la contraction subséquente des CMLVs (Jin L *et al.* 2006a). D'autre part, DAG active la protéine kinase C (PKC) menant à la phosphorylation de la pompe Na⁺/H⁺ (Vallega GA *et al.* 1988) et à l'activation du patron de signalisation

Ras/Raf/MEK/ERK (voir ci-dessous). De plus, la liaison de l'Ang II avec le récepteur AT-1 mène à l'activation de la PLD, ce qui entraîne l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en choline et acide phosphatidique. Ce dernier est rapidement converti en DAG, menant à l'activation de PKC et à la contraction des CMLVs. Chez le rat hypertendu, le patron de signalisation PLC/PLD est significativement augmenté par rapport aux contrôles normotendus suggérant ainsi que l'altération de la signalisation intracellulaire médiée par l'Ang II jouerait un rôle important dans la pathophysiologie de l'hypertension artérielle (Touyz RM *et al.* 2000).

L'Ang II, via le récepteur AT-1 induit la phosphorylation de protéines tyrosines kinases de type récepteur et de type non-récepteur. La transactivation des récepteurs tyrosines kinases par l'Ang II a été démontré pour l'EGF-R (récepteur du facteur de croissance épidermal), le PDGF-R (récepteur du facteur de croissance plaquettaire) et l'IGF-1R (récepteur du facteur de croissance de type insuline). Les mécanismes par lesquels l'Ang II induit la transactivation de ces récepteurs incluent l'activation de tyrosines kinases Pyk 2 (Ca²⁺-dependent proline-rich tyrosine kinase 2), de Src, des DROs et possiblement l'activation des métalloprotéinases de la matrice (MMPs), qui libèrent le facteur de croissance épidermal (EGF) lié à l'héparine (Saito Y *et al.* 2001). Les protéines tyrosines kinases activées par l'Ang II incluent la famille des kinases c-Src, FAK (Focal adhésion kinases), Pyk 2, JAK (Janus family kinases) et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Eguchi S *et al.* 2000). c-Src est une kinase importante puisqu'elle joue un rôle dans les effets trophiques et contractiles de l'Ang II. De plus, l'activation de c-Src par l'Ang II est augmentée en hypertension artérielle expérimentale et humaine. Finalement, c-Src est un régulateur majeur de plusieurs protéines en aval tel que les MAP kinases (Mitogen-activated proteins kinases),

PLC- γ , Pyk2, FAK, JAK, PI3K et la NAD(P)H oxydases (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase) qui sont des protéines majeures dans la croissance et la survie des CMLVs ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette (Touyz RM *et al.* 2001a; Touyz RM *et al.* 2001b; Touyz RM *et al.* 2002a).

Parmi tous les patrons de signalisation induit par l'Ang II dans les CMLVs, le patron de signalisation menant à l'activation des MAP kinases est le mieux caractérisé. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'Ang II active les quatre MAP kinases majeures ERK1/2, p38 MAP kinase, JNK et ERK5.

ERK1 et ERK2 sont activées par les MAP kinases kinases (MAPKK) MAP/ERK kinase 1 (MEK1) et MAP/ERK kinase 2 (MEK2). MEK1/2 est activée par les MAP kinases kinases kinases Raf et Mos suite à la stimulation par différents facteurs mitogènes incluant les facteurs de croissance. MEK1/2 phosphoryle, par la suite, les résidus thréonines et tyrosines de ERK1/2 résultant en l'activation de ERK1/2. La MAP kinase ERK1/2 activée phosphoryle plusieurs substrats incluant des facteurs de transcription tels que Elk1 et c-Myc, et des protéines kinases tel que la kinase ribosomale S6. Cela induit l'activation de gènes tels que c-Fos, importants dans la prolifération et différenciation des CMLVs.

La famille des p38 MAP kinases inclue p38 α (SAPK 2a), p38 β (SAPK 2b), p38 γ (SAPK 3) et p38 δ (SAPK 4). p38 α et p38 β sont exprimées de manière ubiquitaire et sont impliquées dans la prolifération, différenciation et développement cellulaire. De plus p38 MAP kinase joue un rôle important dans la survie cellulaire, l'inflammation et l'apoptose. Les isoformes de p38 MAP Kinase sont activés par MEK 3 et MEK 6 (Krens SF *et al.* 2006).

JNK est phosphorylée et activée par deux MAPKK : JNKK1/MKK4/SEK1 et JNKK2/MKK7 et contrôle diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, différenciation et apoptose. Les cibles moléculaires de JNK incluent, p53 et des facteurs de transcription tels que c-Myc, AP-1 (activator protein 1) et les membres de la famille Bcl-2 importants dans l'apoptose (Davis RJ *et al.* 2000; Lin A *et al.* 2003).

ERK5 également connue sous le nom de BMK1 (Big MAP Kinase 1) est une MAP kinase de haut poids moléculaire qui joue également un rôle important dans la prolifération et différenciation cellulaire (Kato Y *et al.* 1998). De plus, il a récemment été démontré que ERK5 est essentielle au développement cardiovasculaire. ERK5 est activée par MEK5; elle-même activée par MEKK2 et MEKK3. Les substrats d'ERK5 incluent le facteur de transcription MEF2 (Kato Y *et al.* 1997).

L'activation d'ERK1/2, JNK et p38 MAP kinase par l'Ang II est augmentée dans le tissu vasculaire, cardiaque et rénal de plusieurs modèles de rats hypertendus. Ces processus contribuent au remodelage artériel via une augmentation de la croissance cellulaire induite par l'augmentation de l'activation des MAP kinases par l'Ang II (Touyz RM, 2005) (Figure 3).

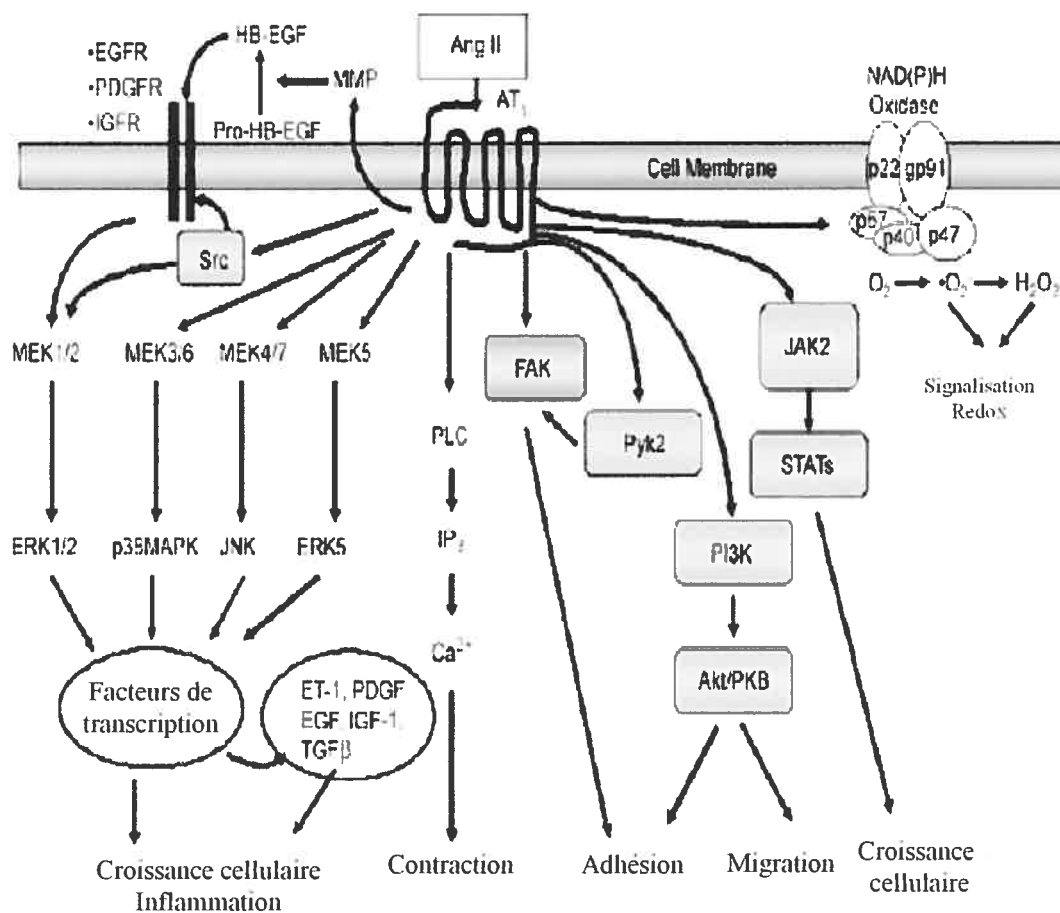


Figure 3. Signalisation intracellulaire induite par l'Ang II dans les cellules musculaires lisses vasculaires.
Adapté de Touyz RM. *Exp Physiol.* 2005

2.1.2.2 La croissance cellulaire induite par l'angiotensine II

L'hypertension artérielle est associée à une augmentation de la croissance des CMLVs. Il a été démontré que l'Ang II jouait un rôle important dans le remodelage vasculaire en hypertension artérielle puisqu'il induisait une augmentation de l'hyperplasie (prolifération) et/ou de l'hypertrophie des CMLVs des artères de résistance des patients hypertendus (Touyz RM *et al.* 1999b). L'hypertrophie cellulaire est associée à une augmentation de la taille des CMLVs due soit à une augmentation de la synthèse protéique ou à une augmentation du volume d'eau intracellulaire. L'hyperplasie cellulaire induite par l'Ang II se manifeste par une augmentation du nombre des CMLVs associée à une augmentation de la synthèse de l'ADN et à une progression des cellules dans le cycle cellulaire (Gibbons GH *et al.* 1992).

L'hypertrophie ainsi que l'hyperplasie des CMLVs sont des processus important dans le remodelage vasculaire en hypertension artérielle (Heagerty AM *et al.* 1993). Dans des modèles d'hypertension expérimentale, l'hypertrophie ainsi que l'hyperplasie contribuent au remodelage vasculaire (Dickhout JG *et al.* 1997). Touyz RM *et al.* ont démontré que l'Ang II stimulait à la fois l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLVs humaines provenant d'artères de résistances et que ces effets sont augmentés au niveau des CMLVs provenant de patients hypertendus (Touyz RM *et al.* 1999c). *In vivo*, il est très difficile de dissocier les effets proliférateurs et hyperplasiques des effets hypertrophiques induits par l'Ang II et la raison est que l'Ang II induit l'activation de d'autres facteurs vasoactifs tels que l'endothéline et l'aldostérone ainsi que l'activation du système nerveux sympathique. Tous ces

facteurs stimulent eux même la croissance des CMLVs (Berk BC *et al.* 2001). De plus, les facteurs de croissances tels que le PDGF et l'EGF sont nécessaires à la progression des cellules à travers la phase G_1 et l'entrée des cellules dans la phase S (Servant MJ *et al.* 2000). Il a été démontré que l'activation des CMLVs par l'Ang II permet aux cellules d'entrer dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire se produit principalement en 2 phases: l'interphase et la mitose. L'interphase comprend les phases G_1 , S et G_2 . Avant d'entrer dans le cycle cellulaire, les cellules sont dans une phase G_0 . Ce n'est qu'après une stimulation spécifique que celles-ci entrent en phase G_1 , la phase où les cellules se préparent pour la réplication de leur ADN. La phase S est la phase de la réplication de l'ADN et la phase G_2 est caractérisée par la préparation de la cellule pour la phase de la Mitose (M). L'entrée des cellules dans la phase G_1 et éventuellement dans la phase S détermine si les cellules subissent un arrêt dans la phase G_1 accompagné d'une hypertrophie des CMLVs ou si les cellules complètent la mitose et prolifèrent. La progression et transition entre les différentes phases du cycle cellulaire est régulée par des protéines spécifiques; les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDKs). Différents complexes Cycline-CDK sont activés pendant les différentes phases du cycle cellulaire (Petkova SB *et al.* 2000).

Les cyclines sont des protéines qui sont synthétisées puis détruites durant chaque cycle cellulaire, leur demi-vie est d'environ 60 minutes. 8 différentes cyclines ont été décrites : A, B, C, D, E, F, G, H. Toutes partagent une région homologue de 150 acides aminés et lient la partie N-terminale des CDKs. Les CDKs sont des serines/thréonines protéines kinases qui se lient aux cyclines et qui sont activées par celles-ci. Le complexe Cycline-CDK est doté d'une activité kinase nécessaire à la

phosphorylation de plusieurs substrats qui contrôlent la progression adéquate du cycle cellulaire (Petkova SB *et al.* 2000).

Entre la phase G_0 et G_1 , la famille des cyclines D s'associent aux CDK4, CDK5 et CDK6. Pendant cette phase, les CDKs coordonnent la phosphorylation de la protéine « retinoblastoma » (pRb, suppresseur de tumeurs) au niveau de sites spécifiques serines et thréonines. La phosphorylation de la protéine Rb libère celle-ci du facteur de transcription E2F (qui forme un hétérodimère avec le DP-1) auquel elle est liée pendant la phase G_0 du cycle cellulaire. L'accumulation d'E2F induit la transcription d'une multitude de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN pendant la phase S. Durant la phase G_1 et durant la transition entre la phase G_1 et S, les CDK2 s'associent avec les cyclines E. L'activité de la cycline E/CDK2 est nécessaire à l'entrée dans la phase S. Finalement, entre la phase S et G_2 , les CDK2 s'associent avec les cyclines A. À la fin de la phase S, le complexe Cycline A/CDK2 lie et phosphoryle E2F/DP-1 pour empêcher la liaison d'E2F/DP-1 à l'ADN. Ce processus qu'on appelle « checkpoint » de la phase S est nécessaire à la progression adéquate du cycle cellulaire. Ainsi, l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 est inhibée prévenant ainsi la mort cellulaire par apoptose (Halaban R *et al.* 2005).

La progression du cycle cellulaire par les CDKs est positivement régulée par les cyclines, et négativement régulée par les inhibiteurs des complexes Cycline-CDKs (CDKIs). Les CDKIs comprennent 2 familles de protéines: les INK4 et les Cip/Kip. La famille des INK4 comprend $p14^{Ink}$, $p15^{Ink}$, $p16^{Ink}$, $p18^{Ink}$ et $p19^{Ink}$ et inhibe les CDKs 4 et 6 liées aux cyclines D. La famille Cip/Kip comprend $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$, $p57^{Kip2}$ et inhibent une plus grande variété de CDKs que les INK4 et préfèrent se lier au complexe cycline/CDK déjà formé (Servant MJ *et al.* 2000).

Nous avons démontré, il y a quelques années, que l'infusion d'Ang II induit une forte prolifération des CMLVs provenant des artères mésentériques de rats Sprague-Dawley. L'Ang II a augmenté l'expression de la cycline D1 et Cdk4, alors que l'expression de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} fut diminuée suggérant que l'Ang II joue un rôle important dans la prolifération des CMLVs (Diep QN *et al.* 2001). Ces résultats ne sont pas surprenant, puisque la progression du cycle cellulaire dans la phase S requière le passage à travers la phase G₁ avec l'activation de cycline D/CDK4 et la sous régulation concomitante de CDKIs. Dans des études effectuées sur des rats génétiquement hypertendus (SHR), il a été démontré que la prolifération des CMLVs aortiques chez les SHR était plus rapide que celle des rats Wistar-Kyoto (WKY). Cette différence de prolifération est associée à la progression différente des cellules dans la phase G₁ et G₂. En effet, les CMLVs provenant de rats SHR expriment des niveaux plus élevés de Cycline D, Cycline E et Cycline A par rapport aux rats WKY (Tanner FC *et al.* 2003). Du point de vue moléculaire, et dépendamment du type cellulaire, l'Ang II régule à la hausse certaines molécules du cycle cellulaire tel p27kip1. p27kip1 est une protéine qui inhibe les CDKs, prévenant ainsi la progression des cellules dans le cycle cellulaire. De plus, il a été démontré que l'Ang II inhibe l'activité de CDK2, ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 et l'hypertrophie subséquente des CMLVs (Braun-Dullaes RC *et al.* 1999). Plusieurs observations supportent le fait qu'une augmentation de la pression artérielle par l'Ang II induit une augmentation de la croissance cellulaire. Aussi, de plus en plus d'évidences suggèrent que la croissance cellulaire vasculaire induite par l'Ang II implique l'activation de la NAD(P)H oxydase et la production subséquente de DROs. En effet, l'hypertrophie induite par l'Ang II dans les CMLVs a été inhibé par la

catalase et les oligonucléotides dirigés contre p22phox (sous-unité de la NAD(P)H oxydase) (Zafari AM *et al.* 1998). De plus, dans les modèles SHR, DOCA-sel et le modèle d'infusion d'Ang II, le remodelage vasculaire a été inhibé par une diète riche en vitamines (C et E) et par des inhibiteurs de la NAD(P)H oxydase (Chen X *et al.* 2001).

2.1.3 Le remodelage de la matrice extracellulaire

Les changements de structure des petites artères en hypertension artérielle sont accompagnés de fibrose vasculaire impliquant l'accumulation des protéines (collagène, l'élastine, la fibrilline, la fibronectine et les protéoglycans) de la matrice extracellulaire. L'intima, la média et l'adventice des petites artères sont constituées majoritairement de collagène de type I et III, alors que les membranes basales des ECs et CMLVs sont constituées de collagène de type I, III, IV et V (Thybo NK *et al.* 1996). La déposition du collagène est excessivement augmentée dans les petites artères des rats SHR et dans l'aorte des rats DOCA-sel (Intengan HD *et al.* 1999a; Karam H *et al.* 1996). De plus, une augmentation de la synthèse d'ARNm du collagène de type I et III ainsi qu'une augmentation de la synthèse protéique de collagène a été observée chez les patients ayant une hypertension essentielle (Intengan HD *et al.* 1999b, Delva P *et al.* 2002). La déposition de la matrice extracellulaire résulte probablement de l'élévation de la pression artérielle et de l'action d'agents vasoconstricteurs tels que l'Ang II (Touyz RM *et al.* 2001c), l'endothéline-1 (Park JB *et al.* 2002a), l'aldostérone et les catécholamines (O'callaghan CJ *et al.* 2002). L'Ang II stimule la production de collagène I dans les CMLVs humaines via l'activation du récepteur AT-1 (Ford CM *et al.* 1999). La déposition de protéines tel que le collagène

contribue à l'épaississement de la média observé dans le remodelage vasculaire hypertrophique (Touyz RM *et al.* 2001c). En plus d'induire la production de collagène, l'Ang II régule également la dégradation de ce dernier en atténuant l'activité des MMPs et en augmentant la production des inhibiteurs des métalloprotéinases-1 (Castoldi G *et al.* 2003).

2.1.4 Inflammation vasculaire

De récentes études ont démontré que l'inflammation systémique constitue un risque pour le développement de maladies cardiovasculaires incluant l'hypertension. Plusieurs marqueurs de l'inflammation sont considérés comme des prédicteurs de risques cardiovasculaires en clinique; cela inclus les interleukines IL-1, IL-6 et IL-18, la protéine C-réactive, les molécules d'adhésions solubles et le TNF- α (tumor necrosis factor) (Sesso HD *et al.* 2003). Dans les CMLVs, cellules endothéliales (ECs), monocytes et macrophages, l'Ang II active les facteur nucléaire NF-kB et AP-1 qui jouent un rôle particulièrement important dans l'inflammation vasculaire puisque qu'ils contrôlent plusieurs gènes pro-inflammatoires tels que les molécules d'adhésion vasculaires-1 (VCAM-1), les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), la E-sélectine, les interleukines (IL-6 et IL-8) et les chémokines (MCP-1) (Ruiz-Ortega M *et al.* 2000). De plus, l'activation de NF-kB et d'AP-1 dans les CMLVs sont redox-dépendants (Redox =Oxydation/réduction), suggérant l'implication du stress oxydant dans la régulation des gènes pro-inflammatoires par l'Ang II (discuté dans le chapitre 3).

2.2 Changements de fonction des artères de résistance

L'endothélium vasculaire joue un rôle primordial dans la fonction des vaisseaux sanguins. Localisé à l'intérieur de la paroi vasculaire, il est directement en contact avec le sang circulant. De ce fait, l'endothélium a pour fonction de répondre aux stimuli mécaniques (pression, stress et stretch) et hormonaux (substances vasoactives et vasodilatatrices) qui régulent la fonction vasomotrice des vaisseaux sanguins. Parmi les substances vasodilatatrices produites par l'endothélium, nous retrouvons le NO, les prostacyclines et les peptides natriurétiques de type C. Le NO active la guanylate cyclase ce qui résulte en une augmentation du GMPc (monophosphate de guanosine cyclique) intracellulaire. Le NO et le GMPc participent à plusieurs processus physiologiques incluant la relaxation des CMLVs, la régulation de la pression artérielle, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la croissance et prolifération cellulaire. L'endothélium a également pour rôle de reconnaître et de répondre aux molécules inflammatoires secrétées dans des conditions pathologiques. Les médiateurs de l'inflammation incluent les ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et NF- κ B. L'endothélium contribue de manière très importante à la mitogénèse, l'angiogénèse ainsi que la perméabilité vasculaire.

La dysfonction endothéliale est une des manifestations les plus précoces des maladies vasculaires. En hypertension artérielle, la dysfonction endothéliale fut décrite dans le début des années 90 et a été confirmée par plusieurs études et dans plusieurs lits vasculaires différents; incluant les petits vaisseaux de résistance (Park JB *et al.* 2001; Schiffrin EL *et al.* 2000). Dans plusieurs modèles animaux, la dysfonction endothéliale est associée à l'augmentation du stress oxydant au niveau de

l'endothélium suite à l'inactivation du NO par l'anion superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$). Le NO est un radical libre, d'une courte durée de vie qui est synthétisé par la NOS. Cette dernière catalyse l'oxydation de la L-arginine pour former le NO et la L-citruline. L'activité de la NOS requière certains cofacteurs telle que la tetrahydrobioptérine. Dans des conditions pathophysiologiques, plus particulièrement lorsque le cofacteur tetrahydrobioptérine est manquant, l'enzyme NOS peut générer la production d'autres DROs tels que l' $\bullet\text{O}_2^-$. Ce phénomène, connu sous le nom de "non-couplage" de la NOS, est associé à la dysfonction endothéliale en hypertension artérielle (Landmesser U *et al.* 2003). Le modèle d'infusion de l'Ang II et le modèle DOCA-sel sont associés à une dysfonction de la relaxation vasculaire à l'acétylcholine. Cette dysfonction est rétablie par le bloqueur du récepteur AT-1 (Losartan) et par la superoxyde dismutase (SOD), suggérant ainsi que l'augmentation du stress oxydant en hypertension artérielle est associée à une dysfonction endothéliale des artères vasculaires.

CHAPITRE 3. LES DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE, LES MODIFICATIONS DES PROTÉINES ET LE SYSTÈME VASCULAIRE

Les DROs sont des molécules hautement réactives dérivées du métabolisme de l'oxygène et retrouvées dans tous les systèmes biologiques ainsi que dans l'environnement. Ils jouent un rôle à la fois physiologique et pathophysiologie dans la biologie du système vasculaire. Normalement, la production cellulaire des DROs est balancée avec leur élimination. Cependant, dans certaines situations pathophysiologiques, il existe un déséquilibre entre la production et l'élimination des DROs résultant en une augmentation de la biodisponibilité des DROs. Ce phénomène est connu sous le nom de stress oxydant (Touyz RM *et al.* 2004a). Le système cardiovasculaire, rénale et nerveux, tous importants dans le développement de l'hypertension, constituent des cibles pour les DROs (Wilcox CS, 2002; Zimmerman MC *et al.* 2002). Plusieurs études cliniques et expérimentales indiquent que le stress oxydant est impliqué dans plusieurs maladies cardiovasculaires incluant l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose. Dans les modèles expérimentaux de l'hypertension artérielle, la production de DROs est augmentée dans les vaisseaux, le rein, le système nerveux ainsi que dans le cœur (Zimmerman MC *et al.* 2002, Jin L *et al.* 2006b). Dans l'hypertension humaine, les niveaux du stress oxydant au niveau systémique sont augmentés. En effet, les niveaux plasmatiques et urinaires des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) et les 8-epi-isoprostanes,

dérivés de la peroxydation des lipides, sont également augmentés (Napoli C *et al.* 2004).

3.1 Le système oxydant

Les DROs incluent l'anion superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion hydroxyle (OH^-), et les dérivés nitrogènes de l'oxygène tels que le NO et le peroxydinitrite (ONOO^-).

Dans la vasculature, les DROs sont produits à partir de plusieurs sources incluant la NAD(P)H oxydase, la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, la cyclooxygénase, la lipoxygénase, l'hème oxygénase, le cytochrome P450 monooxygénase et la xanthine oxydase (Boveris A *et al.* 1976; Touyz RM *et al.* 2004b; Puntarulo S *et al.* 1998). Seulement certaines de ces enzymes ont été démontrées comme étant impliquées dans les maladies vasculaires. Ces enzymes incluent la NAD(P)H oxydase, les enzymes de cytochrome P450 et la xanthine oxydase, qui oxyde la xanthine et l'hypoxanthine pour former le $\bullet\text{O}_2^-$, le H_2O_2 , et l'acide urique (Droge W, 2002).

La NAD(P)H oxydase est une enzyme composée de plusieurs sous-unités qui catalyse la production de l' $\bullet\text{O}_2^-$ par la réduction de l'oxygène d'un électron utilisant la NADH ou NADPH comme donneurs d'électrons : $2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$. Le prototype de la NAD(P)H oxydase est retrouvée au niveau des cellules phagocytaires (neutrophiles, éosinophiles, granulocytes, monocytes et macrophages) et comprend cinq sous-unités : p47phox, p67phox, p40phox, p22phox, gp91 phox (phox pour Phagocyte Oxydase). Les composantes additionnelles de l'enzyme

incluent une petite protéine G nommée Rac 2 (ou Rac 1 dans certaines cellules) et RAP1A. Dans les cellules au repos, p47phox, p67phox et p40phox sont localisées dans le cytosole alors que p22phox et gp91phox (Nox2) sont localisées au niveau de la membrane plasmique sous forme d'une flavoprotéine hétérodimerique, b558. Après activation, p47phox est phosphorylée produisant ainsi une association des sous-unités cytosoliques et leur translocation vers la membrane où elles se lient au cytochrome, b558. Cette association induit l'activation de la NAD(P)H oxydase et la génération subséquente de $l'\bullet O_2^-$ (Babior BM *et al.* 2002).

La NAD(P)H oxydase non- phagocytaire, analogue à la NAD(P)H oxydase phagocytaire, a récemment été découverte dans les cellules vasculaires. Parmi toutes les sources protéiques et enzymatiques de production des DROs, la NAD(P)H oxydase semble être la source majeure de production d' $\bullet O_2^-$ dans les vaisseaux (Berry C *et al.* 2000) et est présente et fonctionnellement active au niveau de toutes les couches des vaisseaux sanguins; au niveau de l'intima (Li JM *et al.* 2003), de la média (Seshiah PN *et al.* 2002), de l'adventice (Rey FE *et al.* 2002) et également au niveau des CMLVs en culture (Touyz RM *et al.* 2002b). Dans les cellules vasculaires, cette enzyme est régulée par plusieurs agents vasoactifs (Ang II, thrombine, endothéline 1), cytokines (interleukine 1, TNF- α), facteurs de croissance et forces mécaniques. Contrairement à la NAD(P)H oxydase des phagocytes, activée suite à une stimulation et qui génère la production d' $\bullet O_2^-$ de manière abrupte et extracellulaire; la NAD(P)H oxydase vasculaire est constitutivement active et produit de manière soutenue de petites quantités d' $\bullet O_2^-$ intracellulaire. Dans plusieurs tissus, les sous-unités de la NAD(P)H vasculaire sont similaires à celles de la NAD(P)H oxydase phagocytaire. En effet, p47phox, p67phox, p22phox et gp91phox ont été identifiées dans les ECs et

dans les fibroblastes vasculaires (Lassegue B *et al.* 2003). Dans les CMLVs, la situation est plus complexe; en effet, dans les CMLVs aortiques de rats, p22phox et p47phox mais pas gp91phox sont présents. Dans les artères de résistance humaines, toutes les sous-unités importantes sont présentes (Touyz RM *et al.* 2002b). De récentes études ont identifié et caractérisé de nouvelles sous-unités uniques aux cellules non-phagocytaires. Ces nouvelles protéines, analogues à la gp91phox (Nox2), ont été identifiées dans toutes les cellules vasculaires et incluent Nox1, Nox3, Nox4 and Nox5 (Nox pour NAD(P)H oxydase) (Suh YA *et al.* 1999; Ago T *et al.* 2004; Cheng G *et al.* 2001). Nox1, pourrait ainsi substituer gp91phox dans les CMLVs aortiques de rats où gp91phox est absent (Suh YA *et al.* 1999). Des études récentes ont démontré que Nox1 requière le recrutement de p47phox et p67phox pour induire l'activation de l'enzyme; de plus Nox1 est régulée par NoxO1 (Nox Organizer 1) et NoxA1 (Nox Activator 1). Nox1 est abondamment exprimée dans toutes les cellules vasculaires et joue un rôle important dans la pathologie de l'hypertension artérielle puisque son expression est augmentée au niveau des vaisseaux endommagés. Par contre, le rôle exact de NoxO1 et NoxA1 dans les cellules vasculaires n'est pas connu (Banfi B *et al.* 2003). Quant aux homologues de gp91phox dans la biologie vasculaire, leurs fonctions nécessitent plus de clarification. Même si il n'est pas encore très clair si p22phox interagit avec tous les homologues de gp91phox, il semblerait que Nox1 interagit avec p22phox dans les CMLVs (Hanna IR *et al.* 2004) (Figure 4).

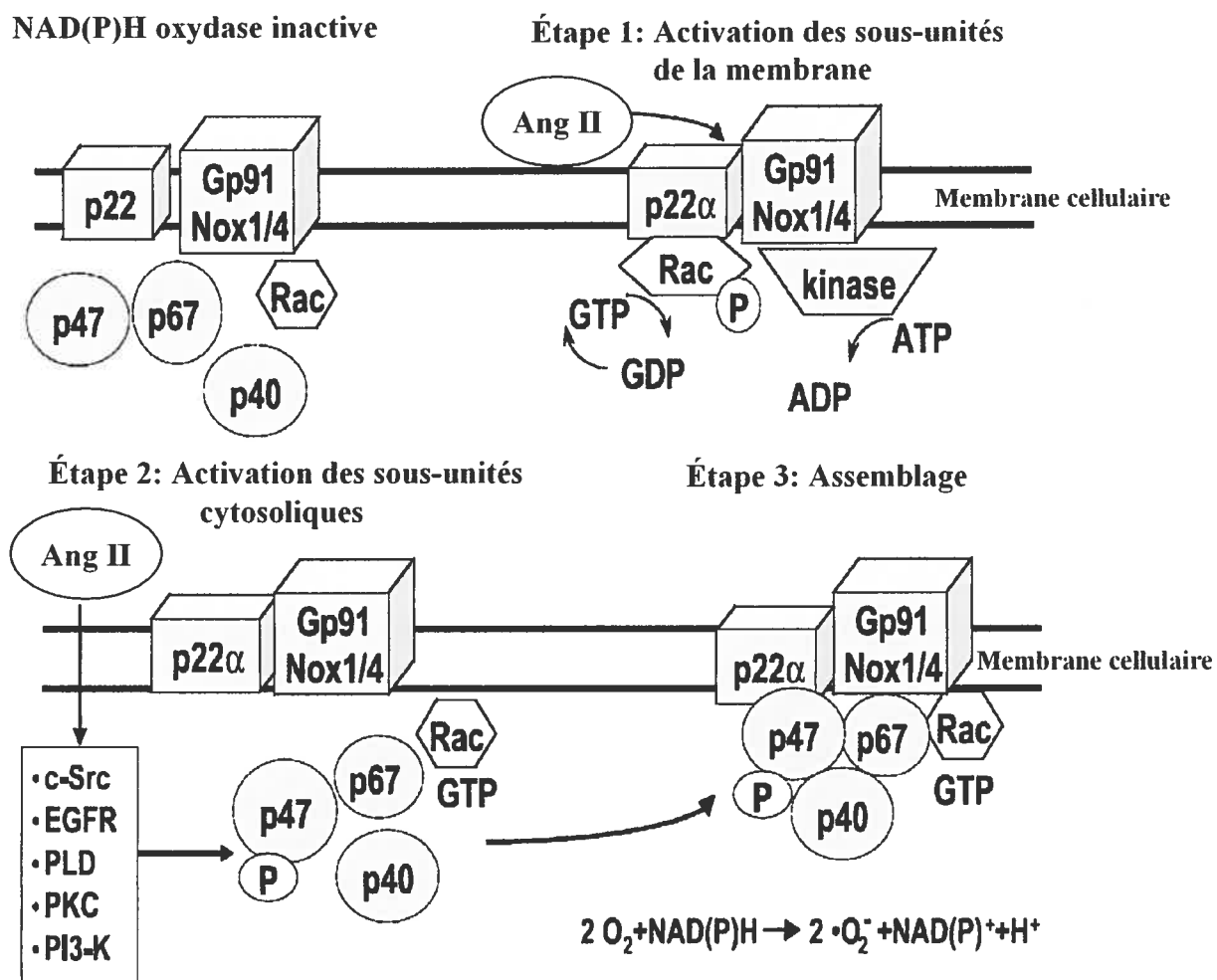


Figure 4. L'activation de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II dans cellules vasculaire.
Adapté de Touyz RM *et al.* *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003a

3.2 Le système antioxydant

Les vaisseaux sanguins possèdent un système antioxydant qui les protège contre les effets néfastes des DROs. Cela inclue 1- un système enzymatique antioxydant comprenant la SOD qui réduit le $\bullet\text{O}_2^-$ en H_2O_2 , ainsi que la catalase et la glutathione peroxydase (GPX) qui réduisent le H_2O_2 en H_2O ; 2- des sources non-enzymatiques telles que les vitamines. Dans les cellules vasculaires, la SOD constitue le système majeur de défense contre l'augmentation de la production de l'anion superoxyde. Trois différentes enzymes SOD ont été identifiées : la manganèse-SOD mitochondriale (Mn-SOD, SOD2), la copper/zinc-SOD (Cu/Zn-SOD, SOD1) et la SOD extracellulaire (EC-SOD, SOD3) (Fridovich I, 1997). Les artères coronaires humaines contiennent un grand nombre de SODs extracellulaires au niveau du milieu interstitiel suggérant l'importance de ces enzymes dans la paroi artérielle (Stralin P *et al.* 1995). Le H_2O_2 est hydrolysé par la catalase et la GPX pour former du H_2O et de l'O_2 . La GPX joue un rôle important puisqu'elle protège les membranes cellulaires contre la peroxydation des lipides dans la mesure où la glutathione réduite donne des protons aux lipides membranaires permettant ainsi de maintenir les lipides membranaires sous formes réduits. En absence de niveaux adéquats de GPX ou d'activité de la GPX, les peroxydes lipidiques et le H_2O_2 ne sont pas détoxifiés et seront ainsi convertis en radicaux lipidiques peroxydes et en radicaux hydroxyles respectivement (Schafer FQ *et al.* 2001). Ceci suggère l'importance du système enzymatique antioxydant endogène dans la protection contre les dommages cellulaires induits par les DROs.

En plus du système enzymatique endogène antioxydant, il existe un autre système non enzymatique dans les systèmes biologiques : acide ascorbique (vitamine C), α -tocophérol (vitamine E), flavonoïdes, caroténoïdes, bilirubine et thiols (Yeum KJ *et al.* 2004).

3.3 Modification des protéines par le stress oxydatif

3.3.1 Modification des protéines par l'oxydation des résidus cystéines

La modification des protéines par l'oxydation des résidus cystéines est la meilleure modification de protéines induite par les DROs décrite jusqu'à présent. L'oxydation des résidus cystéines des protéines tyrosines phosphatases (PTPs) a été particulièrement bien étudiée (voir section ci-dessous). Le groupement sulfhydryque des résidus cystéines est susceptible à l'oxydation par les DROs. Cette oxydation entraîne la formation d'un acide sulfénique (-SOH), sulfinique (-SO₂H) ou sulfonique (-SO₃H) selon le degré d'oxydation de la PTP (Lee SR *et al.* 1998). Ces modifications induisent l'inactivation de l'enzyme si la cystéine est située au niveau du domaine catalytique (Barrett WC *et al.* 1999) ou encore empêchent les facteurs de transcription de se lier à l'ADN si la cystéine est localisée au niveau du domaine de liaison à l'ADN (Abate C *et al.* 1990).

3.3.2 Formation d'un pont disulfide intra- moléculaire

Un pont disulfide intramoléculaire peut être formé après l'oxydation de deux (ou plus) résidus cystéines au niveau de la même molécule. Cette modification induit un changement dans la conformation de la protéine. Certaines études démontrent que ce

mécanisme jouerait un rôle important dans la régulation de certaines protéines tels que les facteurs de transcription (Rainwater R *et al.* 1995).

3.3.3 Dimérisation des protéines par la formation d'un pont intermoléculaire

La formation d'un pont intermoléculaire entre deux protéines peut être formé suite à l'oxydation des cystéines de deux protéines identiques ou différentes; entraînant l'homo ou la dimérisation des deux protéines. La dimérisation de la protéine ASK1 suite à la stimulation des cellules 293 avec le TNF- α ou le H₂O₂ est un exemple de cette modification Redox (Gotoh Y *et al.* 1998).

3.3.4 Formation d'un pont dityrosine

La formation d'un pont dityrosine est impliquée dans la dimérisation des protéines de la matrice extracellulaire. Cette réaction est catalysée par le H₂O₂ ou la peroxydase.

3.3.5 Oxydation des protéines par les métaux (Chimie Fenton)

Certaines protéines dont le site actif contient un ou deux ions de fer sont sensibles à l'oxydation par les DROs. Les protéines telles que IRP1 ou IRP2 (iron regulatory protein 1 ou 2), qui contiennent un groupe 4Fe-4S, sont des cibles de l'oxydation par les DROs. Cette oxydation est catalysée par les métaux (Chimie Fenton) et mène à l'ubiquitination et la dégradation successive des protéines oxydées (Iwai K *et al.* 1998).

3.4 Cibles moléculaires des DROs dans la vasculature

3.4.1 Calcium intracellulaire

Les DROs modulent la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), un déterminant majeur de la fonction contraction/relaxation des CMLVs induite par l'Ang II.

Dans les ECs et CMLVs, il a été démontré que les DROs modulent les $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En effet, l'exposition des cellules endothéliales ombilicales humaines avec la xanthine oxydase/hypoxanthine (XO/HX) conduit à l'augmentation rapide du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ suivie par une phase lente et soutenue. La première phase dépend de l'activation de la PKC et la génération subséquente de l' InP_3 et la deuxième phase dépend de l'influx du calcium du milieu extracellulaire (Dreher D *et al.* 1995). De plus, le peroxyde d'hydrogène induit une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les cellules endothéliales humaines, cette augmentation est dose dépendante (1 $\mu\text{mol/L}$ à 10 mmol/L) et résulte de la libération du calcium des stores du réticulum sarcoplasmique (Hu Q *et al.* 1998). Des effets directs des DROs sur l'homéostasie des CMLVs a été démontré. L'Ang II de manière redox-dépendante augmente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLVs. Ces effets ont été attribués à une mobilisation du Ca^{2+} induite par l'inositol-triphosphate, par une diminution de l'activation de la pompe Ca^{2+} -ATPase et enfin par l'influx du Ca^{2+} du milieu extracellulaire (Lounsbury KM *et al.* 2000). Ces processus sont la cause de l'altération de la contractilité vasculaire associée à l'hypertension lorsque le stress oxydatif est augmenté. En plus de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par des agonistes, il a été démontré que le H_2O_2 et la XO/HX pouvaient avoir des effets directs sur la signalisation de calcium des CMLVs lorsqu'ils sont appliqués de manière exogène.

Dans les CMLVs, les DROs augmentent la $[Ca^{2+}]_i$ en augmentant l'inositol trisphosphate, en inhibant la réentrée du calcium dans les stores intracellulaires et en diminuant la GMPc (Grover AK *et al.* 2003; Gonzalez-Pacheco FR *et al.* 2002). Plusieurs des effets des DROs ont été attribués à l'inhibition de la Ca^{2+} -ATPase, à l'inhibition de la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (SERCA) et à l'activation des canaux calciques (Grover AK *et al.* 1995). L'inactivation des Ca^{2+} -ATPases par les DROs induit une accumulation du calcium intracellulaire. L'augmentation du calcium cytosolique dans les CMLVs entraîne la formation du complexe actine-myosine et à la contraction subséquente des cellules. Par contre, l'accumulation redox-dépendante du Ca^{2+} dans le cytosole des ECs pourrait avoir un effet inverse. En effet, dans les ECs, le calcium entraîne l'activation de la NOS dépendante du Ca^{2+} ; ce qui résulte en la production de NO et la vasodilatation subséquente des artères. De plus, il est possible que l'élévation d'anion superoxyde dans les ECs induit une augmentation de la formation de ONOO- (produit du NO et de l'anion superoxyde). Ce dernier est connu pour avoir des effets vasodilatateurs légers (Li J *et al.* 2005).

3.4.2 MAP (mitogen-activated protein) kinases

La production des DROs est impliquée dans plusieurs processus menant à l'hypertrophie et prolifération des CMLVs. Les MAP kinases constituent une famille de protéines serine/thréonine kinases impliquées dans plusieurs signaux de transduction intracellulaire menant à la prolifération, différenciation et mort cellulaire. Les MAP kinases tels que ERK1/2, p38 MAP kinase, c-Jun N-terminal kinase (JNK) et ERK5, jouent un rôle important dans les CMLVs puisqu'elles sont influencées par

des peptides vasoactifs (Pearson G *et al.* 2001). Leur activation est augmentée en hypertension artérielle influençant ainsi le remodelage vasculaire et les dommages vasculaires associés à l'hypertension artérielle (Xu Q *et al.* 1996).

Dans les CMLVs, les DROs semblent jouer un rôle important dans l'activation de p38 MAP kinase, JNK et ERK5 par l'Ang II. En effet, l'activation de ces MAPK par l'Ang II est inhibée par le Diphenyleneiodonium chloride (DPI, inhibiteur de la NAD(P)H oxydase), les antioxydants (N-acétyl-cystéine), les anti-senses de p22phox ou par une surexpression de la catalase (Viedt C *et al.* 2000). Contrairement à p38 MAP kinase, JNK et ERK5, l'activation de ERK1/2 par l'Ang II semble être non dépendante des DROs (Touyz RM *et al.* 2003b). Cependant, la phosphorylation de ERK1/2 par le facteur de croissance plaquettaire (PDGF) est inhibée par la catalase suggérant que cette activation est redox-dépendante (Sundaresan M *et al.* 1995). En ce qui concerne les effets directs des DROs sur l'activation des MAP kinases dans les CMLVs, il a été démontré que le H₂O₂ influence l'activation de ERK1/2 (CML pulmonaires), JNK, p38 MAPK et ERK5 (Ushio-Fukai M *et al.* 1998b; Abe J *et al.* 1996). Les mécanismes par lesquels le H₂O₂ influence l'activation des MAP kinases dans les CMLVs seront discutés dans le chapitre 6, mais il semblerait que l'activation des MAP kinases par les DROs varie selon les différentes MAP kinases, selon le type cellulaire et selon l'agoniste (Figure 5).

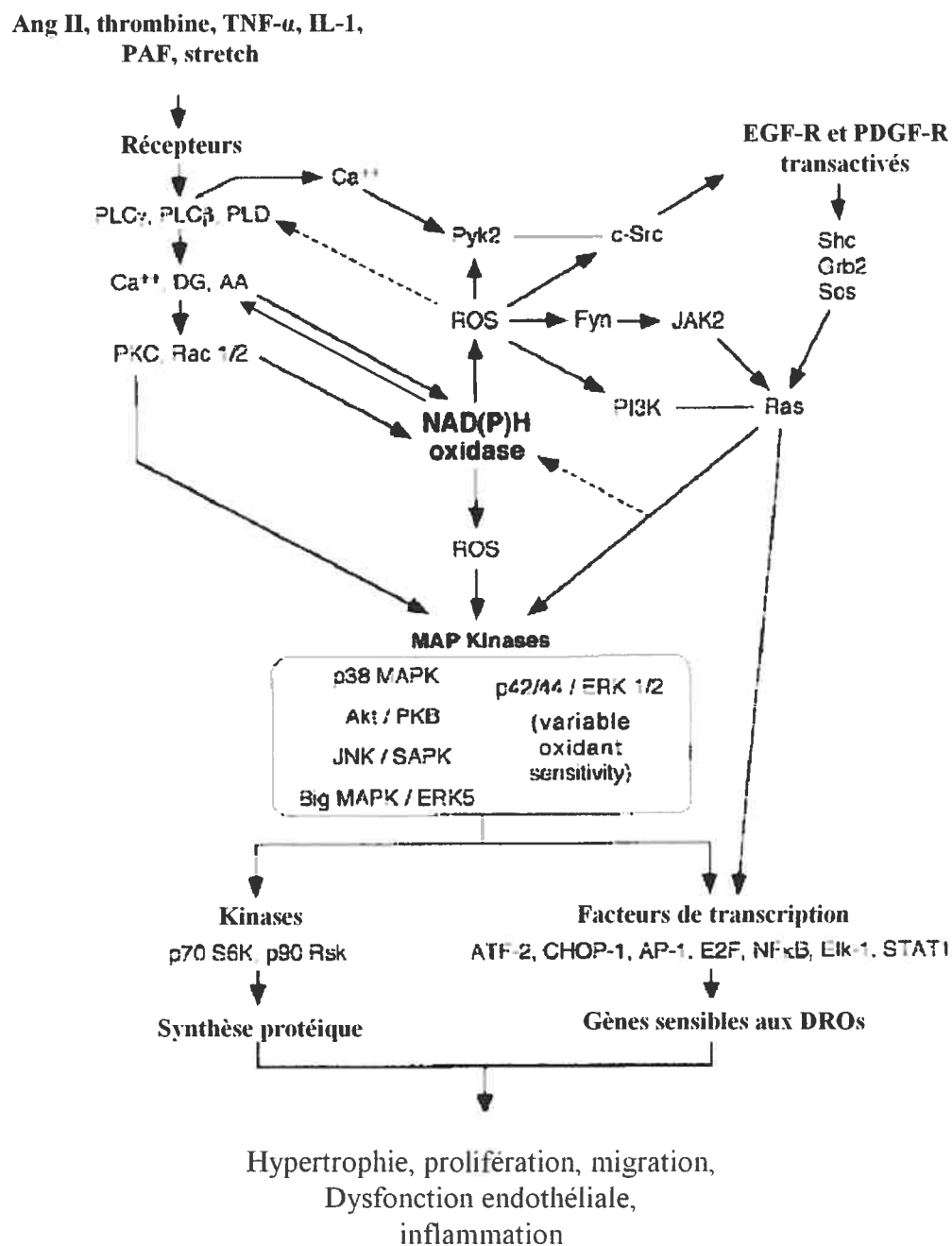


Figure 5. La signalisation redox dans les cellules musculaires lisses vasculaires
PAF=platelet activating factor, AA=acide arachidonique
Adapté de Griendling KK *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000

3.4.3 Protéines tyrosines kinases

La phosphorylation des protéines au niveau de leurs résidus cystéines constitue un des mécanismes les plus importants dans la régulation de la signalisation intracellulaire contrôlant la prolifération, différenciation et migration cellulaire. Plusieurs tyrosines kinases de type récepteur (RTK) tels que l'EGF-R, le PDGF-R et l'IGF-R et non-récepteur (NRTK) sont activées de manière redox-dépendante.

Dans les CMLVs, le H₂O₂ induit la phosphorylation des RTK tel que le récepteur EGF et stimule l'association de ce dernier avec Shc (Src homology complexe)-Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2)-Sos (son-of-sevenless). Shc-Grb2-Sos constitue un complexe de protéines menant à l'activation d'une cascade de signalisation incluant Ras et MAP kinase. L'activation de ces patrons de signalisation mène à l'hypertrophie, migration et prolifération cellulaire (Rao GN *et al.* 1996). Plusieurs NRTK, tels que c-Src, PYK2 JAK2 et Ras sont les cibles des DROs dans les cellules vasculaires. En effet, il a été démontré que dans les CMLVs, la phosphorylation de c-Src au niveau du site d'autophosphorylation (Y418) ainsi qu'au niveau du domaine SH2 (Y215) est inhibée par les antioxydants suggérant que les DROs sont impliqués dans l'activation de cette kinase (Ushio-Fukai M *et al.* 2001). De manière similaire, l'activation de JAK2 semble être redox-dépendante. En effet, la phosphorylation de JAK2 par l'Ang II est inhibée par le DPI et par des anti-senses dirigés contre p47phox (Schieffer B *et al.* 2000). JAK joue un rôle important dans la signalisation cellulaire menant à la croissance et à l'hypertrophie des CMLVs. Suite à la stimulation des cellules, JAK se lie aux récepteurs dimérisés (interféron- α , interféron- γ ou interleukine-2) ou à AT-1. Ceci induit l'autophosphorylation intramoléculaire de JAK et l'activation subséquente des STATs (Transducteur de

signal et activateur de la transcription) et l'activation des gènes menant à la croissance et hypertrophie cellulaire dans les CMLVs (Figure 5).

3.4.4 Protéines tyrosines phosphatases

Les protéines tyrosines phosphatases (PTPs) sont les protéines qui régulent les niveaux cellulaires de phosphotyrosines. Elles jouent un rôle primordial dans la fonction cellulaire et sont divisées en cinq classes : les PTPs classiques de type récepteur, les PTPs classiques de type non-récepteur, les PTPs à double spécificité, les PTPs de bas poids moléculaire et les PTPs lipides. Les PTPs de type récepteur sont principalement retrouvées au niveau de la membrane plasmique alors que les PTPs de type non-récepteur sont retrouvées à plusieurs niveaux des compartiments intracellulaires incluant le cytosol, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique. Les PTPs représentent une large et diverse famille d'enzymes qui jouent un rôle critique dans plusieurs patrons de signalisation (Alonso A *et al.* 2004). Les PTPs sont régulés par phosphorylation, interactions intra- et intermoléculaires, épissage alternatif, transcription et traduction. Plus récemment, il est devenu apparent que cette famille d'enzymes est régulée par un mécanisme d'oxydation réversible. A cause de leurs structures particulières, il a récemment été proposé, *in vivo*, que les PTPs sont susceptibles à l'oxydation et à l'inactivation par les DROs. Ceci a augmenté le niveau de complexité de la régulation de cette famille d'enzymes. Toutes les PTPs possèdent un domaine très conservé composé de 230 acides aminés. Il a récemment été démontré qu'il y avait dans ce domaine un résidu cystéine qui est susceptible à l'oxydation par les DROs. À cause de leur microenvironnement spécial, et plus particulièrement de la présence d'un résidu basique Arginine invariable, les

cystéines des domaines catalytiques des PTPs possèdent un pK_a très bas (entre 5 et 6) (K_a = constante de dissociation de l'acide). Dans des conditions normales, le site actif cystéine est sous forme d'un anion thiolate et de ce fait, il se retrouve excessivement susceptible à l'oxydation. L'oxydation de la cystéine catalytique bloque la capacité des PTPs à déphosphoryler leurs substrats (Figure 6). Il a été démontré que toutes les classes des PTPs sont susceptibles à l'oxydation par le H_2O_2 , incluant les PTPs classiques (Lee SR *et al.* 1998), les PTPs à double spécificité (Denu JM *et al.* 1998), les PTPs de bas poids moléculaires (Caselli A *et al.* 1998) et les PTPs lipidés (Lee SR *et al.* 2002). En général, l'oxydation des résidus cystéines pour former un acide sulfénique est réversible alors que l'oxydation par 2 ou 3 molécules oxydantes rend la PTP irréversiblement inactive (acide sulfinique et acide sulfonique) (den Hertog J *et al.* 2005). Il a été démontré, dans plusieurs types cellulaires, que le PDGF, l'EGF, l'insuline et le TNF- α induisent l'oxydation réversible et l'inactivation de plusieurs PTPs. L'inactivation de ces phosphatases par ces molécules est dépendante de la production du H_2O_2 (Denu JM *et al.* 1998, Rhee SG, 2006). Jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré l'oxydation des PTPs, dans les CMLVs, par l'Ang II. Il est possible que certains des effets de l'Ang II sur le remodelage vasculaire en hypertension artérielle impliquent l'inactivation des PTPs suite à la production des DROs par l'Ang II.

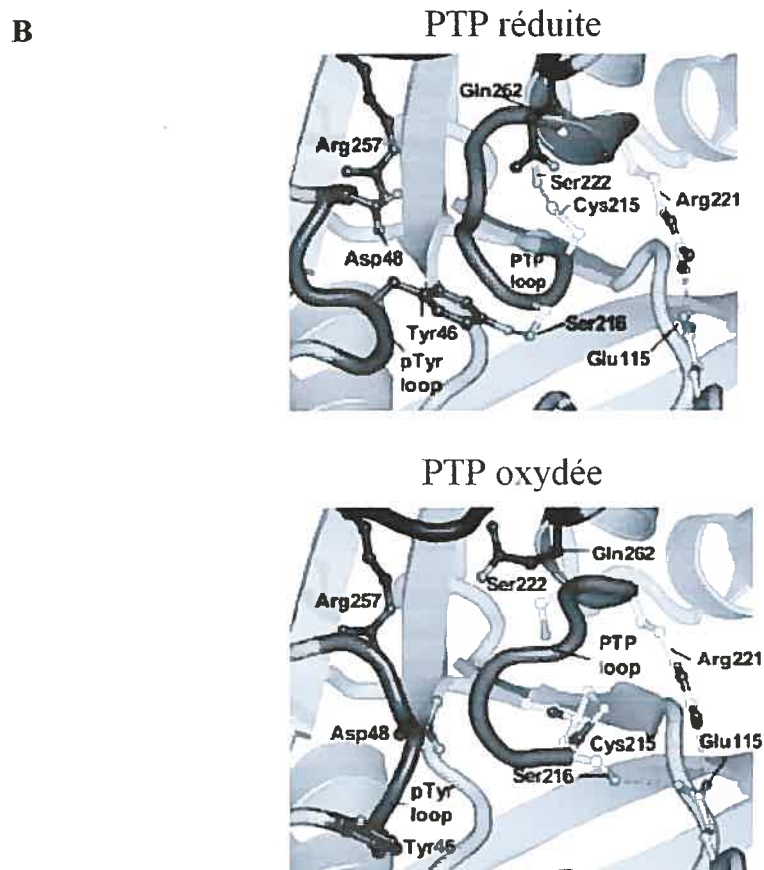
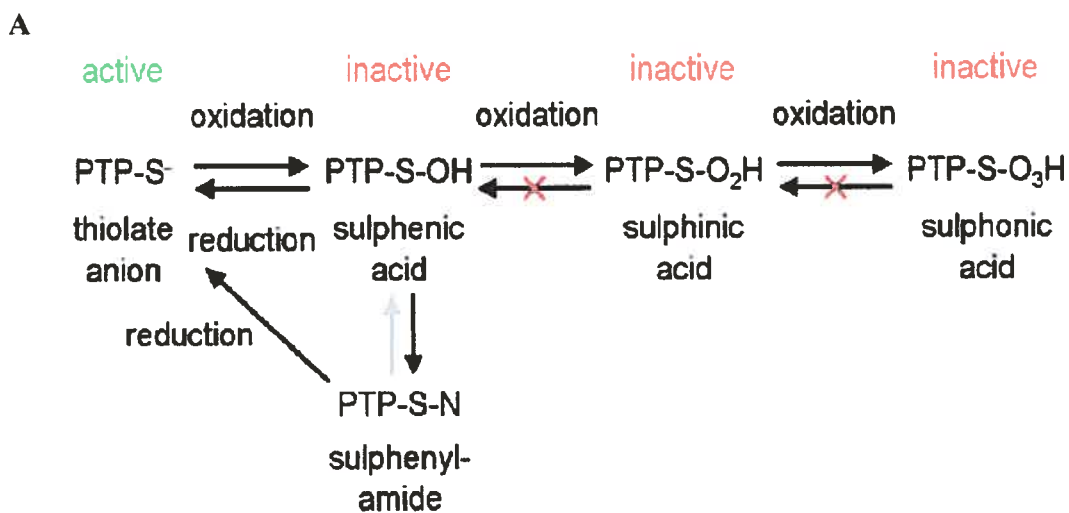


Figure 6. Oxydation des protéines tyrosines phosphatases par les DROs

A. L'oxydation des PTPs entraîne la formation d'un acide sulfénique, sulfinique ou sulfonique (Adapté de den Hertog J *et al. Arch Biochem Biophys.* 2005).

B. L'oxydation de la cystéine catalytique entraîne un changement de conformation et une inactivation de la PTP (Salmeen A *et al. Antioxid Redox Signal.* 2005).

3.4.5 Facteurs de transcription

Plusieurs facteurs de transcriptions tels que NF-kB (Facteur nucléaire kB), AP-1, HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) et egr-1 (Early growth response-1) importants dans la biologie du système cardiovasculaire sont directement activés par les DROs. Les DROs régulent les facteurs de transcription à plusieurs niveaux : 1- il a été démontré que les facteurs de transcription possèdent une cystéine conservée qui est susceptible à l'oxydation par les DROs. Il a été suggéré que la modification des résidus cystéines par les DROs affecte la liaison du facteur de transcription à l'ADN. NF-kB, AP-1 et HIF-1 sont affectés de cette manière (Turpaev KT *et al.* 2002). 2- Les DROs peuvent stimuler la translocation des facteurs de transcriptions, tel que NF-kB, dans le noyau, contribuant ainsi à l'induction des gènes régulés par ces facteurs de transcription (Barchowsky A *et al.* 1995). 3- Finalement, les DROs, tel que le H₂O₂, peuvent induire l'expression de certaines protéines impliquées dans l'activation de facteurs de transcription. En effet, il a été démontré que l'acide gras hydroperoxy et le H₂O₂ activent c-Fos et c-Jun, deux protéines qui forment un hétérodimère, AP-1 (Rao GN *et al.* 1995).

3.4.6 Les protéines du cycle cellulaire

Plusieurs études ont démontré que les DROs peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase G₂. De plus, les DROs peuvent ralentir la progression du cycle cellulaire de la phase G₁ à la phase S. Ces effets sont médiés par l'inhibition de la cycline E/CDK2 et de la cycline B/CDK1 induite par les DROs (Cakir Y *et al.* 2005).

3.6 Régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose par les DROs

En plus de leur importance dans la croissance et prolifération des CMLVs, les DROs jouent un rôle essentiel dans la régulation de la survie cellulaire en agissant comme molécules de la signalisation intracellulaire anti-apoptotique. En plus d'influencer la survie cellulaire, il a été démontré que les DROs suppriment la croissance cellulaire et/ou entraînent l'apoptose (mort cellulaire programmée). De plus en plus d'évidences suggèrent que l'apoptose cellulaire est un phénomène qui joue un rôle important dans le remodelage vasculaire et cardiaque (deBlois D *et al.* 2001; Hamet P *et al.* 1996). En effet, la suppression du H₂O₂ intracellulaire endogène à travers la surexpression de la catalase ou à travers le traitement avec des antioxydants inhibe la prolifération des CMLVs et promeut l'apoptose (Tsai JC *et al.* 1996; Brown MR *et al.* 1999). Plusieurs raisons pourraient expliquer la variabilité des réponses cellulaires (apoptose/survie cellulaire vs. prolifération cellulaire) induites par les DROs. Ceux-ci incluent la sévérité des dommages vasculaires, la dose de DROs, la durée de l'exposition des cellules aux DROs et finalement le type cellulaire. Ainsi, les patrons de signalisation intracellulaire induits par de faibles concentrations de DROs stimulent la prolifération et croissance cellulaire, des concentrations plus modérés en H₂O₂ induisent l'arrêt du cycle cellulaire, alors que de plus hautes concentrations en H₂O₂ (500 µM-1 mM) induisent l'apoptose des CMLVs (Martindale JL *et al.* 2002). Dans les CMLVs, les concentrations modérés en H₂O₂ induisent l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase G1, l'inhibition de l'activation de CDK2, une diminution de l'ARN messenger de la cycline A et l'augmentation de l'expression de

l'ARNm de p21. Tous ces résultats sont obtenus après 2 à 24 h d'exposition avec le H₂O₂ (Deshpande NN *et al.* 2002). Le H₂O₂ promeut la survie cellulaire dans plusieurs types cellulaires suite à l'activation du patron signalisation de la PI3K/Akt (Niwa K *et al.* 711). En effet, le traitement des cellules avec le wortmannin, inhibiteur de la PI3K, bloque l'activation d'Akt par le H₂O₂ et ainsi induit la mort cellulaire (Sonoda Y *et al.* 1999). Le patron de signalisation de PI3K/Akt induit les signaux de signalisation de survie cellulaire à travers la suppression de l'activation de facteurs apoptotiques intracellulaires tels que BAD, caspase 9, GSK3 et IKK α (Datta SR *et al.* 1991). De plus, ASK1, le médiateur en amont de l'activation de JNK et p38 MAP kinase est phosphorylé par Akt, ce qui prévient son habilité à activer JNK. Ainsi Akt protège les cellules contre l'induction de l'apoptose par le H₂O₂ (Kim AH *et al.* 2001). Le rôle des DROs dans l'apoptose fut initialement proposé en se basant sur l'observation que Bcl-2, un inhibiteur général de l'apoptose, a une fonction anti-oxydante. Bcl-2 est localisée au niveau de la membrane externe des mitochondries et lorsque surexprimé, il protège contre la peroxydation des lipides. Le blocage de la libération du cytochrome C par Bcl-2 constitue un mécanisme qui pourrait expliquer l'effet anti-oxydant de Bcl-2. (Hockenbery DM *et al.* 1993). Jusqu'à présent, il a été démontré que plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont impliquées dans l'apoptose induite par les DROs. Dans les myocytes cardiaques, le H₂O₂ induit l'apoptose cellulaire à travers la translocation de Bax/Bad mitochondrial, l'activation de p53, la libération du cytochrome c mitochondrial, l'activation de la caspase 3 et la fragmentation de l'ADN (Johnson TM *et al.* 1996; Cook SA *et al.* 1999). De plus, il a été démontré que l'activation de la cascade de signalisation MAP kinases kinases (telle que ASK1), ou MAP kinases kinases (telle que MKK4/MKK7) et MAP

kinase JNK et p38 MAP kinases, par le H_2O_2 régule un certain nombre de protéines impliquées dans l'apoptose tels que la famille des protéines Bcl-2 (Bcl-x1, Bax) et la ligase ubiquitine ITCH qui promeut la dégradation de FLIP (Shen HM *et al.* 2006). Récemment, il a été démontré que ASK1 est essentielle pour l'activation de JNK et de p38 MAP kinases par les DROs (Tobiume K *et al.* 2001) et qu'une inhibition de ASK 1 avec la thioredoxine inhibe les patrons de signalisation apoptotiques (Liu Y *et al.* 2002). Cependant, il a été prouvé que ERK possède des effets anti-apoptotiques. En effet, l'activation de ERK1/2, ainsi que l'activation de Akt/PKB inhibent l'apoptose cellulaire dans les CMLVs et cellules endothéliales (Nishimura K *et al.* 2006; Allen RT *et al.* 2005).

3.6 Dommages vasculaires induits par les DROs

À travers l'activation des patrons de signalisation décrits ci-dessus, les DROs influent la croissance/migration, la contraction/dilatation et l'inflammation vasculaire. L'hypertension artérielle est associée à une augmentation du stress oxydant qui contribuerait à l'accélération de l'hypertrophie et de la prolifération cellulaire. Ces processus augmentent les dommages vasculaires et le remodelage des artères en hypertension artérielle. En plus d'influencer la croissance cellulaire, les DROs contribuent aux changements de structure des artères de résistance en augmentant la déposition des protéines de la matrice extracellulaire tels que le collagène et la fibronectine. De plus, il semblerait que la migration des CMLVs induite par les facteurs de croissance (PDGF) est inhibée par les antioxydants et les inhibiteurs de la

NAD(P)H oxydase suggérant ainsi l'importance des DROs dans la migration des CMLVs.

Les DROs semblent activer des voies de signalisation intracellulaires menant à la contraction ou à la dilatation des artères; dépendamment du lit vasculaire, des DROs produits et de la présence d'une dysfonction endothéliale.

Le stress oxydant contribue de manière significative à la dysfonction endothéliale et à la perméabilité vasculaire en hypertension artérielle; particulièrement lorsque la réaction inflammatoire est augmentée. Les DROs sont donc impliqués dans l'activation de plusieurs gènes pro-inflammatoires ainsi que dans le recrutement de cellules inflammatoires (Lassegue B *et al.* 2004).

CHAPITRE 4. LES DÉRIVÉS RÉACTIFS DE L'OXYGÈNE ET L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

4.1 Le stress oxydant dans les modèles génétiques d'hypertension

Une augmentation de la génération des DROs dans les artères de résistance, les grosses artères et les reins des modèles SHR et SHR-SP suggère l'importance du stress oxydant dans le développement de cette pathologie. Il semblerait que dans le modèle SHR, les DROs jouent un rôle important dans le développement de l'hypertension puisque la présence de stress oxydatif dans les vaisseaux est détectée avant même le développement de la maladie (Nabha L *et al.* 2005). L'augmentation du stress oxydant dans les reins et les vaisseaux sanguins du modèle SHR est associée à une augmentation de l'expression et de l'activation de la NAD(P)H. Dans ces modèles, même si d'autres sources enzymatiques tels que la xanthine oxydase, le "non-couplage" de la eNOS et les sources mitochondriales, semblent jouer un rôle dans la production des DROs dans les cellules vasculaires, il semblerait que la source majeure de production de l' $\bullet\text{O}_2^-$ est la NAD(P)H oxydase (Chabrashvili T *et al.* 2002; Lassegue B *et al.* 2003). Cependant, dans les ECs, le "non-couplage" de la eNOS semble jouer un rôle primordial dans la dysfonction endothéliale en hypertension (Adlam D *et al.* 2006). De plus, l'expression endogène des protéines antioxydantes, incluant la thioredoxine, est altérée dans l'aorte, le cœur et les reins des rats SHR et SHR-SP comparativement aux rats normotendus WKY (Ulker S *et al.* 2003). La

contribution du stress oxydant à la dysfonction endothéliale observée dans l'hypertension génétique a été démontrée. En effet, la biodisponibilité vasculaire du NO se trouve diminuée suite à l'augmentation de la production de l'anion superoxyde chez le rat SHR et SHR-SP. Les antioxydants tels que la catalase, le tiron (un "scavenger" de l' $\bullet\text{O}_2^-$), l'allopurinol (inhibiteur de la xanthine oxydase) et l'indométhacine (inhibiteur de la cyclooxygénase) améliorent la dysfonction endothéliale des aortes des rats SHR (Ulker S *et al.* 2003). Finalement, la consommation d'antioxydants (alpha-tocophérol) pendant toute la durée de vie des rats SHR atténue l'augmentation de la pression artérielle et diminue le stress oxydant par diminution de l'expression des sous-unités de la NAD(P)H oxydase (sous-unités gp91phox et p22phox), suggérant la contribution du stress oxydant à l'élévation de la pression artérielle (Zhan CD *et al.* 2004). La contribution de la NAD(P)H à l'élévation de la pression artérielle fut également confirmée et démontrée en utilisant un modèle de souris "knock out" pour la p47phox (p47phox^{-/-}). Ce dernier ne développe pas d'hypertension artérielle suite à l'infusion chronique d'Ang II (Landmesser U *et al.* 2002).

4.2 Le stress oxydant dans les modèles expérimentaux d'hypertension

L'existence d'un état de stress oxydant a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux d'hypertension artérielle incluant le modèle d'infusion chronique de l'Ang II (Reckelhoff JF *et al.* 2003) ou d'aldostérone (Iglarz M *et al.* 2004), le 2K1C (Welch WJ *et al.* 2003) et le modèle Dahl sensible au sel (Tojo A *et al.* 2002).

L'utilisation d'inhibiteurs de la NAD(P)H oxydase (apocynine), d'inhibiteurs de la xanthine oxydase (allopurinol), d'antioxydants ou des mimétiques de la SOD (tempol), induit la réduction de la pression artérielle et prévient le développement de l'hypertension dans plusieurs modèles expérimentaux, suggérant ainsi l'importance des DROs dans cette pathophysiologie. En plus de leurs effets sur la pression artérielle, les antioxydants régressent le remodelage vasculaire, l'inflammation vasculaire, rénale et cardiaque et améliorent la dysfonction endothéliale dans ces modèles (Park JB *et al.* 2002b; Rodriguez-Iturbe B *et al.* 2003). Cependant, il est important de mentionner que la pression artérielle n'est pas nécessairement la cause principale de l'augmentation du stress oxydant en hypertension et ceci est confirmé par le fait que l'hypertension artérielle induite par la norépinephrine n'est pas associée à une augmentation du stress oxydant, et les antioxydants comme la SOD ne diminuent pas la pression artérielle dans ce modèle (Laursen JB *et al.* 1997).

4.3 Le stress oxydant dans l'hypertension humaine

Le stress oxydant est augmenté chez les patients avec une hypertension essentielle, rénovasculaire ou encore sensible au sel. Les marqueurs du stress oxydant (8-epi-isoprostanés, malondialdéhyde, TBARS) sont augmentés chez les patients hypertendus vs. normotendus (Laffer CL *et al.* 2006). Ceci est probablement relié à une augmentation de la formation des DROs, à une diminution de la biodisponibilité du NO et à une diminution de l'expression et activité de certains antioxydants. Ces phénomènes sont associés à une réduction de la vasorelaxation médiée par le NO

(dysfonction endothéliale) ainsi que par une augmentation des facteurs de risque pour d'autres maladies cardiovasculaires (Minuz P *et al.* 2002).

Chez l'humain, le polymorphisme de certains gènes, incluant celui de la sous-unité p22phox de la NAD(P)H oxydase et celui du récepteur AT-1, ont été démontré comme étant important dans la pathophysiologie de l'hypertension artérielle. Le polymorphisme C242T de p22phox est associé à l'hypertension artérielle et à une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase et de l'expression de p22phox (Moreno MU *et al.* 2006). Il existe une relation directe entre le niveau de stress oxydant et le polymorphisme de gènes impliqués dans la régulation du RAS. En effet, le polymorphisme du gène récepteur de l'Ang II AT-1 (-153A/G) est associé à une augmentation des niveaux de F2-isoprostanes dans l'urine suggérant l'importance de l'activation du RAS dans la production du stress oxydant (Ormezzano O *et al.* 2005).

4.4 Stratégies pour réduire le stress oxydant en hypertension artérielle

Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre dans le but de réduire la production des DROs en hypertension artérielle. Ces stratégies comprennent l'augmentation de la biodisponibilité des antioxydants par la diète et la diminution de la génération des DROs.

Plusieurs études prospectives ont démontré que la prise d'antioxydants (vitamines) prévient le développement de l'hypertension artérielle chez l'humain (Digiesi V *et al.* 2001). De plus, la consommation de vitamine E diminue les risques de développement des maladies coronaires (Stampfer MJ *et al.* 1993). En plus de

prévenir la survenue de la pathologie, d'autres études ont démontré que les antioxydants diminuaient la pression artérielle ainsi que l'hypertension chez l'humain (Duffy SJ *et al.* 1999, Galley HF *et al.* 1997). De plus en plus d'études cliniques supportent le fait que les antioxydants ont un effet bénéfique sur l'amélioration de la fonction endothéliale. Ces études ont une durée de quelques mois, utilisent des doses élevés en vitamines E et C et ont comme but d'étudier l'activation des marqueurs solubles de la fonction endothéliale sur la fonction artérielle (Aminbakhsh A *et al.* 1999). Cependant, même si plusieurs études ont démontré que les antioxydants possédaient plusieurs avantages dans la protection des dommages cardiovasculaires et plus particulièrement dans l'amélioration de la fonction endothéliale, plusieurs grandes études cliniques n'ont pas réussi à démontré un rôle bénéfique des antioxydants dans la réduction de la mortalité due aux dommages associés à certaines maladies cardiovasculaires. Plusieurs raisons pourraient expliquer la variabilité entre ces grandes études cliniques. La première raison est le choix des vitamines antioxydantes ainsi que le choix de la dose utilisée. En effet, la majorité des grandes études cliniques effectuées jusqu'à présent mesurent l'effet de suppléments de vitamines E sur les risques cardiovasculaires. Ces études comprennent CHAOS (Stephens NG *et al.* 1996), GISSI-Prevenzione (GISSI-Prevenzione Investigators) et HOPE Trial (Yusuf S *et al.* 2000). L'utilisation de suppléments de vitamine E seule et sans combinaison avec d'autres antioxydants pourrait expliquer les résultats négatifs obtenus dans ces études. En effet, ces études n'ont pas démontré de diminution de la mortalité au niveau des groupes traités avec les antioxydants versus les groupes placebo. Il est important de mentionner que les études épidémiologiques qui ont trouvé une association entre la consommation de vitamine E et la baisse de l'incidence

de maladies coronaires vasculaires ont été associé à des consommations plus élevées en vitamine E ainsi qu'à des combinaisons avec d'autres vitamines et micronutriments (Gaziano JM *et al.* 1995; Kushi LH *et al.* 1996). En plus de la dose et du choix des vitamines, le choix de la population étudiée et la durée des études pourraient également expliquer le manque de consistance des études cliniques randomisées. En effet, dans les études cliniques prospectives et randomisées telles que CHAOS (2002 patients), GISSI-prevenzione trial (3658 patients) ou HOPE (9541 patients), la durée du traitement a été de 1,5, 3,5 et 4,5 années respectivement, ce qui semblerait insuffisant pour obtenir des résultats satisfaisants. Finalement, il se pourrait que les patients recrutés n'aient pas réussi à répondre aux effets bénéfiques des antioxydants utilisés à cause de l'avancement de leur état de santé cardiovasculaire. En effet, les patients recrutés dans ces études étaient atteints d'une maladie vasculaire coronarienne (CHAOS), possédaient un antécédent d'infarctus du myocarde (GISSI-Prevenzione), ou encore étaient atteints de d'autres maladies telles que le diabète ou maladies vasculaires coronariennes (HOPE investigators).

OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Hypothèse globale:

Nous proposons que les voies de signalisation intracellulaire induites par les DROs sont différentiellement régulées dans les CMLVs de rats hypertendus SHR vs normotendus WKY.

Les objectifs spécifiques de la thèse sont de:

1- Déterminer si les voies de signalisation calciques, régulées par les DROs, sont augmentées en hypertension artérielle. Pour cela, nous avons élucidé le rôle du H_2O_2 et de $l'\bullet O_2^-$ dans la mobilisation du calcium intracellulaire au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires provenant d'artères de résistance de rats spontanément hypertendus (SHR) et de rats normotendus (WKY). De plus, nous avons examiné les réponses contractiles des artères de résistance suite à la stimulation par le H_2O_2 . Finalement, nous avons évalué la contribution des canaux calciques dans la modulation de la $[Ca^{2+}]_i$ par les DROs (Chapitre 5).

2- Évaluer l'activation des MAP kinases par le H_2O_2 dans les CMLVs provenant des artères de résistance de rats SHR et WKY. Nous avons caractérisé le rôle des tyrosines kinases de type non-récepteur et récepteur ainsi que le rôle des PKC dans l'activation d'ERK1/2 et de p38 MAP kinase par le H_2O_2 dans les CMLVs de rats SHR et WKY (Chapitre 6).

3- Déterminer si l'Ang II augmente la signalisation des protéines tyrosines kinases, décrite précédemment dans les CMLVs des rats SHR, à travers une inactivation par oxydation des PTPs. Nous avons donc étudié la régulation des PTPs par l'Ang II et le H₂O₂ dans les CMLVs provenant de rats hypertendus SHR et normotendus WKY. Nous voulions tester l'hypothèse que la production des DROs par l'Ang II, tel que décrit précédemment, influence l'augmentation de la phosphorylation des protéines tyrosines intracellulaires en induisant une oxydation réversible et une inactivation des protéines tyrosines phosphatases telle que la SHP-2. La SHP-2, tel que décrit ci-dessous, est une PTP qui est impliquée dans la signalisation intracellulaire des récepteurs tyrosines kinases. De plus, nous voulions évaluer si l'inactivation de la SHP-2 influençait à la hausse certains patrons de signalisation intracellulaires médiés par l'Ang II (Chapitre 7).

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES ARTICLES

CHAPITRE 5

Differential Calcium Regulation by Hydrogen Peroxide and Superoxide in Vascular Smooth Muscle Cells from SHR

**Differential Calcium Regulation by Hydrogen Peroxide and
Superoxide in Vascular Smooth Muscle Cells from SHR**

Fatiha Tabet BSc, Carmine Savoia MD, Ernesto L. Schiffrin MD. PhD, Rhian M.

Touyz MD. PhD

CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension, Clinical Research Institute
of Montreal, Univ of Montreal, Quebec, Canada

Short title: Reactive oxygen species and calcium signaling

Key words: Vascular smooth muscle cells, calcium, hydrogen peroxide, superoxide
anion, and calcium channels.

5.1 ABSTRACT

We investigated the role of reactive oxygen species (ROS), particularly hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) in the regulation of vascular smooth muscle cell (VSMC) Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and vascular contraction and assessed whether redox-dependent Ca^{2+} signaling and contraction are altered in hypertension. VSMCs and mesenteric arteries from Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were studied. Cells were stimulated with H_2O_2 (10^{-4} mol/l) or LY83583 ($\text{O}_2^{\bullet-}$ generator, 10^{-5} mol/l). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and cytosolic $\text{O}_2^{\bullet-}$ were measured by fura-2AM and tempo-9-AC fluorescence respectively. L-type and T-type Ca^{2+} channels were assessed using verapamil/diltiazem and mibefradil respectively and mRNA and protein expression of these channels was assessed by real-time PCR and immunoblotting respectively. H_2O_2 time-dependently increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contraction with significantly greater effects in SHR versus WKY ($p < 0.001$). LY83583 increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in both strains, but responses were blunted in SHR. Removal of extracellular Ca^{2+} abrogated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 and $\text{O}_2^{\bullet-}$. Verapamil and diltiazem, but not mibefradil, significantly decreased H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses with greater effects in SHR ($p < 0.01$). L-type and T-type Ca^{2+} channel inhibition reduced LY83583-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase only in WKY cells. Both types of Ca^{2+} channels were expressed (mRNA and protein) in VSMCs from WKY and SHR, with greater abundance in SHR than WKY (2-3 fold). These results demonstrate that ROS increase vascular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contraction, primarily via extracellular Ca^{2+} influx. Whereas responses to H_2O_2 are enhanced, $\text{O}_2^{\bullet-}$ -mediated actions are blunted in SHR. These effects may relate to differential activation of Ca^{2+}

channels by H_2O_2 and $\cdot\text{O}_2^-$. Enhanced activation of L-type Ca^{2+} channels and increased Ca^{2+} influx by H_2O_2 may contribute to increased Ca^{2+} signaling in VSMCs from SHR.

5.2 INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), particularly superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), have been suggested as mediators of vascular structural and functional changes in hypertension (1,2). Findings from *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate that O_2^- and H_2O_2 increase vascular contractility stimulate vascular smooth muscle cell (VSMC) growth and induce inflammatory responses, characteristic features of small arteries in hypertension (1-5). ROS mediate these effects through redox-sensitive signaling pathways (6,7). In cultured VSMC and endothelial cells ROS influence MAP kinases, tyrosine kinases and transcription factors (8-10). In addition recent studies suggest that O_2^- and H_2O_2 modulate intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), a major determinant of contraction/relaxation in vascular smooth muscle (11).

In the vasculature, redox-sensitive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ effects have been demonstrated primarily in the endothelium. In isolated endothelial cells, increased generation of endogenous O_2^- by xanthine oxidase/hypoxanthine results in a rapid $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, followed by a slow and sustained elevation (12). This biphasic response is due to Ca^{2+} mobilization from cytosolic stores followed by extracellular Ca^{2+} influx (12). In bovine aortic endothelial cells, O_2^- inhibits Ca^{2+} release-activated entry (CRAC) and Ca^{2+} extrusion and accelerates Ca^{2+} leak from intracellular stores (13). O_2^- and H_2O_2 seem to differentially regulate endothelial $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Whereas O_2^- elicits a slow and sustained increase in endothelial $[\text{Ca}^{2+}]_i$, H_2O_2 induces concentration-dependent Ca^{2+} oscillations (14). Furthermore O_2^- increases bradykinin- and ATP -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (15) while ONOO^- inhibits agonist-stimulated Ca^{2+} responses (16). Since endothelial

$[Ca^{2+}]_i$ plays an important role in nitric oxide regulation, these redox-sensitive processes may influence endothelium-dependent vasodilation. In fact, endogenous H_2O_2 has been suggested to be an endothelium-derived hyperpolarizing factor (17).

Emerging evidence indicates that ROS also influence $[Ca^{2+}]_i$ in VSMCs (11,18,19). Most studies demonstrate an inhibitory effect of ROS on sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -transporting ATPase (SERCA), thereby decreasing Ca^{2+} transport into reticular stores resulting in cytosolic Ca^{2+} accumulation and increased $[Ca^{2+}]_i$ (18,20). Mechanisms whereby H_2O_2 inhibits SERCA are probably through oxidation of sulfhydryl groups or by direct attack on the ATP binding site (18,21). Superoxide stimulates IP_3 -induced Ca^{2+} release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum, further increasing $[Ca^{2+}]_i$ (22). Ca^{2+} -activated Cl^- currents $I_{Cl(Ca)}$ are also regulated by redox-sensitive processes (23). Diamide, a non-specific oxidant, enhanced the amplitude of $I_{Cl(Ca)}$ by stimulating Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in smooth muscle cells from rabbit portal vein. Not all studies reported a $[Ca^{2+}]_i$ stimulatory effect of ROS. In cultured aortic smooth muscle cells, $\bullet O_2^-$ attenuates Ca^{2+} mobilization and decreases Ca^{2+} sensitivity of the contractile machinery (24). Indeed, studies of ROS effects on vascular tone are contradictory. In most studies H_2O_2 and $\bullet O_2^-$ induce vasoconstriction and attenuate endothelium-dependent vasodilation (20,25,26). However, in cerebral arterioles and in isolated coronary arteries H_2O_2 induces vasodilation (27,28) and in isolated bovine aortic smooth muscle cells, $\bullet O_2^-$ attenuates contraction (24). Reasons for these conflicting results probably depend on the blood vessel studied, the concentration and type of free radical employed and the presence or absence of vascular endothelium.

Few studies have examined the role of ROS in vascular Ca^{2+} homeostasis and contraction in hypertension. Gao and Lee demonstrated that H_2O_2 -induced contractile responses are enhanced in isolated mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with normotensive Wistar Kyoto (WKY) controls (29). Rodriguez-Martinez et al (30) reported that H_2O_2 -induced contraction is augmented in de-endothelialized aorta from SHR. However, the role of VSMC Ca^{2+} in these processes is unclear. To address this we investigated whether H_2O_2 and $\cdot\text{O}_2^-$ modulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMCs from WKY and SHR and assessed whether $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to ROS are differentially regulated in hypertension. Furthermore we studied putative mechanisms whereby ROS influence $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by examining the role of Ca^{2+} channel-mediated Ca^{2+} influx.

5.3 METHODS

Animals

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Clinical Research Institute of Montreal (IRCM). Male WKY and SHR (Taconic Farms Inc, Germantown, NY) were used. Rats were killed by decapitation.

Cell Culture

VSMCs derived from mesenteric arteries were isolated from 10 WKY and 10 SHR rats and characterized as described previously (31). Briefly, mesenteric arteries were cleaned of adipose and connective tissue and VSMCs dissociated by enzymatic digestion. The tissue was filtered and the cell suspension centrifuged and resuspended in DMEM containing heat-inactivated calf serum, HEPES, L-glutamine, penicillin, and streptomycin. VSMCs were grown on round glass coverslips (25 mm diameter) in plastic dishes and maintained at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂/95% air). Low-passaged cells (passages 3 to 6) were used. Before experimentation, cells were rendered quiescent by serum deprivation and maintenance in serum-free DMEM for 24 hours.

Measurement of [Ca²⁺]_i

[Ca²⁺]_i was measured using the fluorescent probe fura-2AM (Molecular Probes, OR) as previously described (31). On the day of the study, the culture medium was replaced with warmed modified Hank's buffered saline containing (mmol/l): 137 NaCl, 4.2 NaHCO₃, 3 Na₂HPO₄, 5.4 KCl, 0.4 KH₂PO₄, 1.3 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 glucose and HEPES (pH 7.4). Cells were loaded with fura-2AM (4 μmol/l), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 0.02% pluronic F-127

(Molecular Probes) and incubated for 30 minutes at 37 °C in a humidified incubator. Under these loading conditions, the ratiometric fluorescence cell images are homogeneous, indicating no significant compartmentalization of the dye. After 30 min, the loaded cells were washed and used after a 5 to 10-minute stabilization period. All washing procedures and experiments were performed at room temperature, thereby minimizing compartmentalization and cell extrusion of the dye. The coverslip-containing cells was placed in a stainless steel chamber and mounted on the stage of an inverted microscope ($\times 40$ -oil immersion objective), and an Attofluor fluorescence digital imaging system (Zeiss) was used, as previously described (31). Fura-2AM loaded cells were exposed to an excitation wavelength of 340 and 380 nm while monitoring the emission signal at 510 nm.

$[Ca^{2+}]_i$ responses were measured in cells exposed to increasing concentrations of H_2O_2 and LY83583, a superoxide-generating naphthoquinolinedione (32) in the absence (2 mmol/L EGTA) or presence of extracellular Ca^{2+} . To determine whether H_2O_2 or LY83583-induced $[Ca^{2+}]_i$ changes were dependent on Ca^{2+} influx through L or T-type calcium channels, L-type (verapamil and diltiazem) and T-type (mibefradil) Ca^{2+} channel inhibitors were used. In these experiments, cells were pretreated for 15-20 minutes with vehicle, verapamil (10^{-5} mol/L), diltiazem (10^{-5} mol/L) or mibefradil (10^{-5} mol/L) before H_2O_2 (0 to 90 minutes) or LY83583 (0 to 75 minutes) stimulation. To determine whether H_2O_2 induced $[Ca^{2+}]_i$ changes was reversible after 75 minutes of stimulation, VSMCs were washed with Hank's buffer during 20 minutes and the $[Ca^{2+}]_i$ were measured.

Measurement of $\cdot O_2^-$ production.

To determine whether LY83583 does in fact stimulate $\cdot\text{O}_2^-$ generation in our experimental model, cells were exposed to LY83583 (0 to 75 minutes) and the fluorescence intensity was measured using the probe Tempo-9-AC (33). Cells were loaded with the fluoroprobe (4 $\mu\text{mol/L}$) for 30 mins at room temperature and washed three times with Hank's modified buffer. Loaded cells were allowed to equilibrate for 5-10 minutes before analysis. In some experiments, cells were pre-exposed to tempol (1 mmol/L, for 20 minutes), a superoxide anion scavenger, and then subjected to LY83583 stimulation. Fluorescence was measured using an Attofluor system (Zeiss) as we described (33). Excitation and emission wavelengths were set at 360 nm and 510 nm respectively.

Vascular Smooth Muscle α_{1C} and α_{1G} subunits mRNA levels

Cellular mRNA levels of α_{1C} (L-type Ca^{2+} channels) and α_{1G} subunits (T-type Ca^{2+} channel) were studied by real-time PCR. Total RNA was isolated from WKY and SHR VSMCs by using Trizol Reagent (GIBCO-BRL). Reverse transcription was performed using 2 μg of RNA as previously described (34). Real-time PCR was performed with a Stratagene Mx4000 System for relative quantification of VSMCs α_{1C} and α_{1G} subunits mRNA. Sense and antisense primers were designed to generate short amplification products (82 bp for α_{1C} subunit, 239 bp for α_{1G} subunit, and 107 bp for ribosomal protein S16, used as an internal standard), which spanned one intron region to detect contamination by genomic DNA. Primers for VSMCs α_{1C} subunit were: sense 5'-CCTCATTGGCTCACAGAAGT-3' and antisense 5'-TACATCTTCAGGAGCATTCT-3'; for VSMCs α_{1G} subunit: sense 5'-GCTGGAATGTGCTGGACGGCTTG-3' and antisense 5'-ATGAAGAAGGCACAG

CAAATGACC -3'; and for S16: sense 5'-AGGAGCGATTTGCTGGTGTGG-3', and antisense 5' GCTACCAGGGCCTTTGAGATG-3'. To validate our real-time PCR protocol, gene-specific standard curves for VSMCs α_{1C} , α_{1G} subunits and S16 were generated from serial dilutions of the cDNA. Using the Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) and a final 0.5 $\mu\text{mol/L}$ concentration of primers, real-time PCR was conducted with an initial denaturing interval (95°C, 15 minutes) and then 40 sequence cycles: 94°C (30 seconds), 56°C (45 seconds), and 72°C (30 seconds). A melting curve analysis was also performed to check absence of formation of primer-dimers. All samples were run in duplicate. Samples from WKY cDNAs were used as calibrators and variations of α_{1C} and α_{1G} subunits from SHR VSMCs were calculated as a relative quantity compared with WKY group. Results are expressed as the ratio between the gene of interest and S16 relative quantities.

Western Blot Analysis

VSMCs from WKY and SHR, passages 3 to 6, were washed twice with cold PBS. Lysis buffer (Na pyrophosphate 50 mmol/L, NaF 50 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na_3VO_4 2 mmol/L, HEPES pH 7.4, 10 mmol/L, Triton X-100 0.1%, PMSF 50 mmol/L, pepstatin 1 $\mu\text{g/ml}$, leupeptin 1 $\mu\text{g/ml}$, aprotinin 1 $\mu\text{g/ml}$) was added and the plates were placed on dry ice for 5 min. Cells were scraped off, transferred to Eppendorf tubes, and sonicated for 5 sec. The protein supernatant was separated by centrifugation and protein concentrations were determined with the Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). 30 μg of proteins were loaded on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (Boehinger, Mannheim, Laval, Quebec,

Canada) for 2h30 at 100 V. Membranes were blocked with blocking buffer, containing 5% w/v non-fat dry milk in PBS and incubated overnight at 4°C. Membranes were incubated for 2 h with anti- α_{1C} subunit antibody (1:1000) (Chemicon International), recognizing L-type Ca^{2+} channels. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence and blots analyzed densitometrically (Image-Quant software, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Preparation and Study of Small Arteries

16 weeks old WKY and SHR rats were killed by decapitation and the third-order superior mesenteric artery (≈ 2 mm in length) was isolated and mounted on 2 glass microcannulas in a pressurized myograph under constant intraluminal pressure (45 mm Hg) (35). The vessels were equilibrated with warm (37°C) physiological salt solution (in mmol/L: NaCl 120, $NaHCO_3$ 25, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, $MgSO_4$ 1.18, $CaCl_2$ 2.5, EDTA 0.026 and glucose 5.5) and bubbled continuously with 95% air and 5% CO_2 to achieve a pH of 7.4. Vessels were used if they constricted ($> 50\%$) in response to potassium (125 mmol/L KCl) with norepinephrine (10^{-5} mol/L). Contraction to H_2O_2 (10^{-4} mol/l) was assessed in a time dependent manner and was expressed as a percentage of maximal response.

Statistical Analysis

Results are presented as the mean \pm SEM and compared by two ways ANOVA with repeated measures followed by a Bonfferoni post-test. $P < 0.05$ was considered significant.

5.4 RESULTS

Effect of H₂O₂ and LY83583 on VSMC [Ca²⁺]_i

At low concentrations, H₂O₂- and LY83583-induced [Ca²⁺]_i effects were modest. Nevertheless H₂O₂ and LY83583 dose-dependently increased [Ca²⁺]_i, with significant responses observed at 10⁻⁴ mol/L and 10⁻⁵ mol/L respectively (Figure 1). Subsequent studies were performed using these concentrations. To ensure that cells were viable following H₂O₂ stimulation, an additional set of experiments was performed where [Ca²⁺]_i was determined in H₂O₂-stimulated cells following a washout period (20 minutes). As demonstrated in figure 2, following the washout phase, [Ca²⁺]_i returned to pre-stimulated levels.

Effect of H₂O₂ on VSMC [Ca²⁺]_i in the absence and presence of extracellular Ca²⁺.

In the presence of extracellular Ca²⁺, H₂O₂ induced a significant increase in [Ca²⁺]_i (Figure 3). Responses were slow in both WKY and SHR and were significantly increased above basal levels after 30 minutes. 75 minutes after stimulation, [Ca²⁺]_i was increased more than 3-fold in SHR, which was significantly greater than responses in WKY (p<0.001). In the absence of extracellular Ca²⁺, H₂O₂-mediated [Ca²⁺]_i effects were abrogated in both groups.

Effect of L-type and T-type calcium channel inhibitors on H₂O₂ induced [Ca²⁺]_i increase.

Removal of extracellular Ca²⁺ abolished H₂O₂-mediated actions, suggesting that [Ca²⁺]_i responses are due to extracellular Ca²⁺ influx (Figure 3). To investigate whether Ca²⁺ channels play a role in this process, cells were pretreated with two different types of L-type Ca²⁺ channel blockers, verapamil and diltiazem. In addition,

T-type Ca^{2+} channels were investigated using the T-type blocker, mibefradil. As shown in figures 4a and 4b, both verapamil and diltiazem decreased H_2O_2 -mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients, with significantly greater effects in SHR. Pre-exposure of cells to mibefradil did not produce any significant change in H_2O_2 induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses (Figure 4c).

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ effect of LY83583 in the presence and absence of extracellular Ca^{2+} .

To evaluate whether intracellular $\cdot\text{O}_2^-$ influences $[\text{Ca}^{2+}]_i$, VSMCs were exposed to LY83583, a cell membrane-permeable naphthoquinolinedione, which generates $\cdot\text{O}_2^-$ (32). To verify that LY83583 does in fact induce $\cdot\text{O}_2^-$ formation in VSMCs, we measured cytosolic $\cdot\text{O}_2^-$ levels using Tempo-9AC (33). As demonstrated in figure 5, LY83583 stimulation resulted in a slow and sustained increase in Tempo-9AC fluorescence both in WKY and SHR cells (~ 2 fold). To confirm that this increase was due to intracellular increase in $\cdot\text{O}_2^-$, cells were pre-exposed to tempol, a superoxide dismutase (SOD) mimetic, which significantly attenuated LY83583-induced fluorescence.

LY83583 induced a time-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in both WKY and SHR cells (Figure 6). Maximal responses were obtained within 45 minutes and were significantly blunted in SHR compared with WKY cells ($p < 0.05$). Removal of extracellular Ca^{2+} abolished LY83583-elicited $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses.

Effect of L-type and T-type calcium channel inhibitors on LY83583-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses.

As demonstrated in figures 7a and 7b, verapamil and diltiazem significantly decreased ($p < 0.05$) LY83583-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals in WKY ($p < 0.05$), but not in SHR cells. Similarly to, mibefradil significantly reduced LY83583 effects in WKY

only ($p < 0.001$) (Figure 7c). Although Ca^{2+} channel blockers decreased LY83583-induced actions in WKY, responses were not completely inhibited.

VSMCs α_{1C} and α_{1G} subunits mRNA and protein content.

Relative quantification of α_{1C} and α_{1G} subunits mRNA content in VSMCs from WKY and SHR by real time PCR showed a 2.5-fold increase in mRNA levels of α_{1C} subunit in SHR VSMCs as compared to WKY ($p < 0.05$). Similar result was observed with the α_{1G} subunit mRNA contents (~3-fold increase in SHR as compared to WKY VSMCs, $p < 0.01$) (Figure 8A). In addition to increased mRNA expression, protein content of L-type Ca^{2+} channel was enhanced in VSMCs from SHR (Figure 8B).

Functional effect of H_2O_2 .

To evaluate whether ROS influence Ca^{2+} -dependent function, we assessed vascular contractile responses to H_2O_2 . H_2O_2 induced significant contraction, which was time-dependent (Figure 9). Contractile responses were significantly higher in mesenteric vessels from SHR compared to WKY ($27.6 \pm 4.2\%$ of contraction in SHR vs. $12 \pm 3.3\%$ of contraction in WKY) (Figure 9).

5.5 DISCUSSION

Despite the fact that ROS have been implicated to play a role in Ca^{2+} signaling, there is a paucity of information regarding ROS effects on Ca^{2+} homeostasis in VSMCs, and to our knowledge, there are no detailed studies comparing redox-sensitive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in VSMCs from normotensive and hypertensive rats. Here we demonstrate that H_2O_2 and $\cdot\text{O}_2^-$ increase vascular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contractile responses in WKY and SHR. These effects are dependent on extracellular Ca^{2+} and are mediated primarily via influx through Ca^{2+} channels, which appear to be upregulated in SHR. Of particular interest, whereas H_2O_2 -mediated effects are increased, LY83583-mediated actions are blunted in SHR compared with WKY. Our data suggest that H_2O_2 may be more important than $\cdot\text{O}_2^-$ in enhanced vascular Ca^{2+} signaling and contraction in SHR and may be attributable, at least in part, to increased VSMC Ca^{2+} channel activation.

Similar to our findings, others reported that H_2O_2 increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in vascular cells (11,19,26,36). However, whereas previous studies showed that H_2O_2 regulates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by altering inositol 1,4,5 trisphosphate (IP_3) and SERCA activity (18,21,22,37), we found that H_2O_2 increases Ca^{2+} mainly by stimulating extracellular Ca^{2+} influx. This was evidenced by findings that depletion of extracellular Ca^{2+} abolished H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in both WKY and SHR cells. These responses appear to be mediated via L-type, rather than through T-type Ca^{2+} channels, since verapamil and diltiazem, selective L-type Ca^{2+} channel blockers, but not mibefradil, specific T-type Ca^{2+} channel blocker, reduced H_2O_2 effects. Exact mechanisms whereby ROS influence Ca^{2+} channels are unclear

but altered redox state of SH-groups may be important (38). Most studies examining effects of ROS on Ca^{2+} channels were performed in cardiac cells, where a direct correlation between H_2O_2 levels and L-type Ca^{2+} channel activation was found (39). However, not all studies reported stimulatory effects of ROS. In mouse cerebral cortical neurons, hydroxyl ion suppressed Ca^{2+} influx through L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (40). These differential responses may relate to cell-type specificity. Neither verapamil nor diltiazem completely blocked H_2O_2 -mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ effects in VSMCs, indicating that mechanisms other than Ca^{2+} channels contribute to Ca^{2+} influx. It is possible that sodium-calcium exchangers (NCX), non-specific ion channels and the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) may play a role, since these transporters are also regulated by H_2O_2 (41).

The magnitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhibition by verapamil and diltiazem was greater in SHR than WKY cells, suggesting that H_2O_2 -induced effects on L-type Ca^{2+} channels are enhanced in SHR. This is supported by our findings that Ca^{2+} channel expression, both at the mRNA and protein levels, was augmented in SHR compared with WKY. This may contribute to the augmented $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response by H_2O_2 in SHR and may explain why H_2O_2 -induced contractile responses are exaggerated in SHR (29,30). In fact increased VSMC Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels has been reported in hypertension. In mesenteric VSMCs from SHR membrane density of whole-cell and single-channel L-type Ca^{2+} currents is increased and L-type Ca^{2+} currents are larger compared with WKY rats (42,43). Pratt et al. described a potential mechanism for this increase (44). They showed that the α_{1c} subunit mRNA and pore forming protein are upregulated in SHR mesenteric and skeletal arteries and that the increased number of L-type Ca^{2+} channel pores are associated with the generation of abnormal tone (44).

Compared with H₂O₂, LY83583-mediated actions were modest. In fact maximal [Ca²⁺]_i responses to H₂O₂ were increased 3-4-fold, whereas responses were only increased about 1.5-fold by LY83583. In WKY cells, verapamil, diltiazem and mibefradil attenuated LY83583-induced effects, suggesting that [•]O₂⁻ regulates Ca²⁺ influx, at least in part, through activation of L- and T-type Ca²⁺ channels. These [•]O₂⁻ -dependent processes do not seem to be important in SHR, since Ca²⁺ channel inhibitors had no effect on [Ca²⁺]_i responses, which were in fact blunted. These findings indicate differential regulation of [Ca²⁺]_i by [•]O₂⁻ in WKY and SHR. Reasons underlying reduced [Ca²⁺]_i responsiveness to [•]O₂⁻ are unclear, but may relate to Ca²⁺ channel insensitivity by [•]O₂⁻ in SHR. In fact some studies reported that ROS inhibits Ca²⁺ channel activity and Ca²⁺ influx, which could also contribute to reduced [Ca²⁺]_i effects (20,39). However, these aspects require further clarification.

The functional significance of ROS-induced [Ca²⁺]_i regulation relates to our findings that H₂O₂ influenced vascular contraction and that responses were enhanced in SHR. These results confirm those of Gao and Lee (29) who showed that H₂O₂ induces an exaggerated contraction in mesenteric arteries of SHR through thromboxane A₂ production. However, not all studies demonstrated vasoconstriction in response to ROS. Endothelium-dependent H₂O₂-induced vasorelaxation has been demonstrated in human coronary and mesenteric arteries, cat cerebral arterioles, piglet pial arterioles, mouse mesenteric arteries and rat cerebral arteries (45-48). Reasons for these differences may relate to vessel heterogeneity and/or to the free radical species studied. In fact ROS have been described to have dual vasoconstriction/vasodilation properties (49).

In summary, our study demonstrates the novel findings that H_2O_2 and $\cdot\text{O}_2^-$ differentially regulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMCs from SHR. Whereas H_2O_2 -induced effects are enhanced, $\cdot\text{O}_2^-$ actions are blunted. Mechanisms underlying these processes may relate to increased activation of L-type Ca^{2+} channel by H_2O_2 , but not by $\cdot\text{O}_2^-$. Furthermore, since H_2O_2 effects were significantly greater than those of $\cdot\text{O}_2^-$, we propose that H_2O_2 may be a more important ROS signaling molecule than $\cdot\text{O}_2^-$ in VSMCs, as has been previously suggested (8-10). An aspect of our study that should be considered relates to the concentration of H_2O_2 used. Although 10^{-4} mol/L is not a physiological concentration, under pathological conditions, such as in ischemia-reperfusion injury and in vascular damage associated with hypertension, diabetes and atherosclerosis, vascular H_2O_2 can increase to levels within the μmolar range (20,50,51). Thus data from our study identify a redox-sensitive Ca^{2+} process that may play an important role in altered vascular function in hypertension.

5.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by grant 57786 and a group grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). F Tabet received a fellowship from the CIHR/Canadian Hypertension Society and from the Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. RM Touyz received a scholarship from the CIHR/Canadian Hypertension Society.

5.7 REFERENCES

1. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2000;2(1):98-105.
2. Schiffrin EL, Touyz RM. Inflammation and Vascular Hypertrophy Induced by Angiotensin II: Role of NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species Independently of Blood Pressure Elevation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):707-709.
3. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998; 32(3):488-495.
4. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(22):10045-10048.
5. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 95(3):588-593.
6. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(6):L1005-L1028.
7. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47-95.

8. Griending KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(10):2175-83.
9. Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(2):159-167.
10. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):940-948.
11. Roveri A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, van Amsterdam FT, Ratti E, Ursini F. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 1992; 297(2):265-270.
12. Dreher D, Jornot L, Junod AF. Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca^{2+} stores and protein synthesis in human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76(3):388-395.
13. Kimura C, Oike M, Ito Y. Acute glucose overload abolishes Ca^{2+} oscillation in cultured endothelial cells from bovine aorta: a possible role of superoxide anion. *Circ Res.* 1998;82(6):677-685.

14. Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1998;97(3):268-275.
15. Graier WF, Hoebel BG, Paltauf-Doburzynska J, Kostner GM. Effects of superoxide anions on endothelial Ca^{2+} signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(9):1470-1479.
16. Elliott SJ. Peroxynitrite modulates receptor-activated Ca^{2+} signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1996;270(6 Pt 1):L954-L961.
17. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci*. 2003;92(1):1-6.
18. Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):C294-301.
19. Krippeit-Drews P, Haberland C, Fingerle J, Drews G, Lang F. Effects of H_2O_2 on membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of cultured rat arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209(1):139-145.
20. Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med*. 2000 1;28(9):1362-1369.
21. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca^{2+} -ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246(2):589-601.

22. Suzuki YJ, Ford GD. Superoxide stimulates IP₃-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1992;262(1 Pt 2):H114-H116.
23. Greenwood IA, Leblanc N, Gordienko DV, Large WA. Modulation of ICl(Ca) in vascular smooth muscle cells by oxidizing and cysteine-reactive reagents. *Pflugers Arch.* 2002;443(3):473-482.
24. Kimura C, Cheng W, Hisadome K, Wang YP, Koyama T, Karashima Y, Oike M, Ito Y. Superoxide anion impairs contractility in cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(1):H382-390.
25. Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med.* 1988;4(2):107-120.
26. Yang ZW, Zheng T, Wang J, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Hydrogen peroxide induces contraction and raises [Ca²⁺]_i in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360(6):646-653.
27. Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):H1262-1266.
28. Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol.* 1998;275(4 Pt 2):H1283-1289.

29. Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol.* 2001;134(8):1639-1646.
30. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.* 1998;125(6):1329-35.
31. Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Mesenteric vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats display increased calcium responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens* 1994; 12(6):663-673.
32. Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O²⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77(1):29-36.
33. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src Induces Phosphorylation and Translocation of p47phox: Role in Superoxide Generation by Angiotensin II in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(6):981-987.
34. Touyz RM, Endemann D, He G, Li J-S, Schiffrin EL. Role of AT₂ receptors in Ang II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. *Hypertension.* 1999; 33: 366-373.
35. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and

- inflammation in blood vessels of angiotensin-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation*. 2002; 105:2296-2302
36. Schachter M, Gallagher KL, Patel MK, Sever PS. Oxidants and vascular smooth muscle. *Biochem Soc Trans* 1989; 17(6):1096-1097.
 37. Elmoselhi AB, Samson SE, Grover AK. SR Ca^{2+} pump heterogeneity in coronary artery: free radicals and IP₃-sensitive and -insensitive pools. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1):C1652-C1659.
 38. Az-ma T, Saeki N, Yuge O. Cytosolic Ca^{2+} movements of endothelial cells exposed to reactive oxygen intermediates: role of hydroxyl radical-mediated redox alteration of cell-membrane Ca^{2+} channels. *Br J Pharmacol*. 1999;126(6):1462-1470.
 39. Thomas GP, Sims SM, Cook MA, Karmazyn M. Hydrogen peroxide-induced stimulation of L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes and its inhibition by adenosine A₁ receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(3):1208-1214.
 40. Shirotani K, Katsura M, Higo A, Takesue M, Mohri Y, Shuto K, Tarumi C, Ohkuma S. Suppression of Ca^{2+} influx through L-type voltage-dependent calcium channels by hydroxyl radical in mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;92(1-2):12-18.
 41. Wehage E, Einfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23150-23156.

42. Ohya Y, Abe I, Fujii K, Takata Y, Fujishima M. Voltage-dependent Ca^{2+} channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1993; 73(6):1090-1099.
43. Ohya Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, Abe I, Fujishima M. Single L-type calcium channels in smooth muscle cells from resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31(5):1125-1129.
44. Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, Bonnet P, Rusch NJ. Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension* 2002; 40(2):214-219.
45. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci.* 2003;92(1):1-6.
46. Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-Harasawa L, Mukai Y, Hirakawa Y, Akaike T, Takeshita A. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1224-1230.
47. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1521-1530.
48. Lacza Z, Puskar M, Kis B, Perciaccante JV, Miller AW, Busija DW. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(1):H406-411.

49. Touyz RM. Activated oxygen metabolites: do they really play a role in angiotensin II-regulated vascular tone? *J Hypertens* 2003;21:2235-2238
50. Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 1):L897-902.
51. Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem*. 1994;269(39):24156-24162.

5.8 LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Line graphs demonstrate effects of increasing concentrations of H₂O₂ (Figure 1a) and LY83583 (Figure 1b) on [Ca²⁺]_i responses in VSMCs from WKY rats. Responses were measured after 15 minutes of incubation. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus basal values.

Figure 2. Bar graph indicate [Ca²⁺]_i responses before (basal) and after (wash) H₂O₂ (10⁻⁴ mol/L, 75 min) stimulation in VSMCs from WKY and SHR. Responses were measured after 20 minutes of washing with Hank's buffer. Results are presented as mean±SEM. * p<0.05, **p<0.01 vs. counterpart control. † p< 0.05 vs. H₂O₂ treatment.

Figure 3. Line graphs demonstrate effects of H₂O₂ (10⁻⁴ mol/L) on [Ca²⁺]_i in the absence and presence of extracellular Ca²⁺ (as described in the method). Cells were pre-incubated in a Ca²⁺ free buffer for 15 minutes prior to addition of H₂O₂. Results are presented as the H₂O₂- induced change in [Ca²⁺]_i measured using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means±SEM, with each data point comprising from 10-20 cells. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus H₂O₂ counterpart. †p<0.001 versus WKY group.

Figure 4. Figure 4a. Representative tracings of [Ca²⁺]_i responses to H₂O₂ (10⁻⁴ mol/L) in the presence or absence of verapamil (10⁻⁵ mol/L). Figure 4b. Representative tracings of [Ca²⁺]_i responses to H₂O₂ in the presence or absence of diltiazem (10⁻⁵

mol/L). Figure 4c. Representative tracings of $[Ca^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 in the presence or absence of mibefradil (10^{-5} mol/L). VSMCs were pretreated for 15-20 minutes with vehicle, verapamil, diltiazem or mibefradil before H_2O_2 (0 to 90 minutes) stimulation. Results are presented as the H_2O_2 - induced change in $[Ca^{2+}]_i$ measures using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10-20 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus H_2O_2 counterpart. † $p < 0.001$ versus WKY group.

Figure 5. Line graphs demonstrate effects of LY83583 (10 μ mol/L) on Tempo-9-AC fluorescence in the absence and presence of tempol (1 mmol/l) (as described in the method). Cells were pretreated with tempol for 20 minutes prior LY83583 stimulation. Results are presented as the LY83583- induced change in Tempo-9-AC fluorescence. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10-20 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ versus LY83583 counterpart.

Figure 6. Line graphs demonstrate effects of LY83583 (10 μ mol/L) on $[Ca^{2+}]_i$ in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} . Cells were pre-incubated in a Ca^{2+} free buffer for 15 minutes prior to addition of H_2O_2 . Results are presented as the LY83583 -induced change in $[Ca^{2+}]_i$ measured using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10-20 cells. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus LY83583 counterpart. † $p < 0.05$ versus WKY group.

Figure 7. Figure 7a. Line graphs demonstrate effects of LY83583 (10 $\mu\text{mol/L}$) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of verapamil (10^{-5} mol/L). Figure 7b. Line graphs demonstrate effects of LY83583 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of diltiazem (10^{-5} mol/L). Figure 7c. Line graphs demonstrate effects of LY83583 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of mibefradil (10^{-5} mol/L). VSMCs were pretreated for 15-20 minutes with vehicle, verapamil, diltiazem or mibefradil before LY83583 (0 to 75 minutes) stimulation. Results are presented as the LY83583 -induced change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measures using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as mean \pm SEM, with each data point comprising from 10-20 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus H_2O_2 counterpart. † $p < 0.05$ versus SHR group.

Figure 8. Figure 8a. Bar graph indicate relative quantification of α_{1C} (L-type Ca^{2+} channel) and α_{1G} subunits (T-type Ca^{2+} channel) mRNA content in VSMCs from WKY and SHR. Results are expressed as the ratio between the gene of interest and the gene of ribosomal protein S16 relative quantities. Results are presented as mean \pm SEM for $n=6$. Figure 8b. Representative immunoblot demonstrate protein content of α_{1C} subunits in VSMCs from WKY and SHR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WKY.

Figure 9. Line graph demonstrates the time-dependent response of WKY and SHR mesenteric resistance arteries to H_2O_2 (10^{-4} mol/L) stimulation. Results are presented as a percentage of contraction as compared to the basal state and are expressed as mean \pm SEM. $n=5$. * $p < 0.05$ vs. WKY.

Figure 1

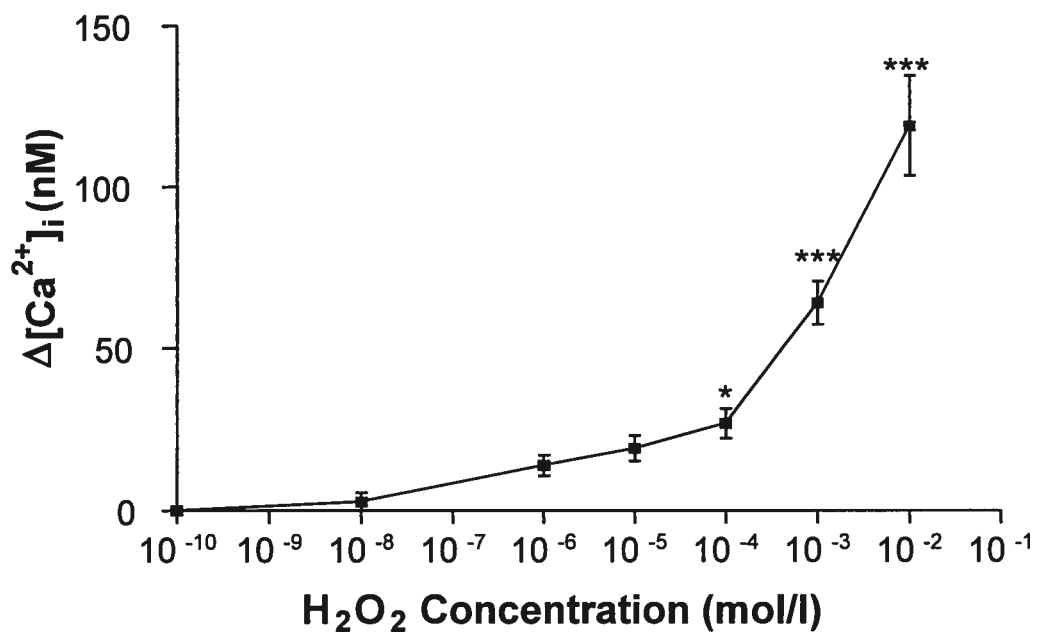
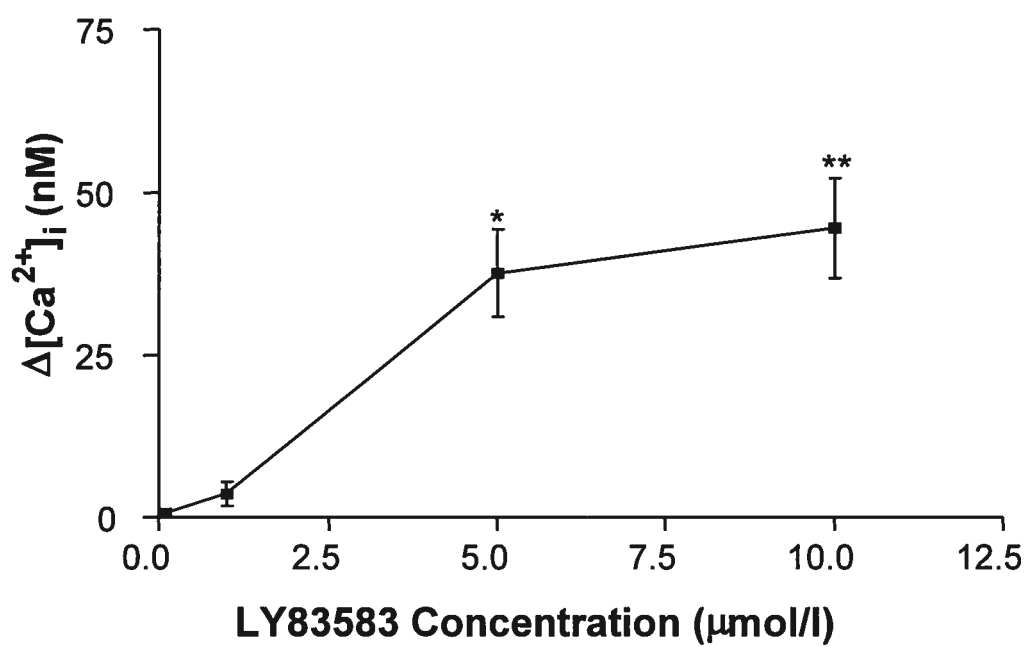
A**B**

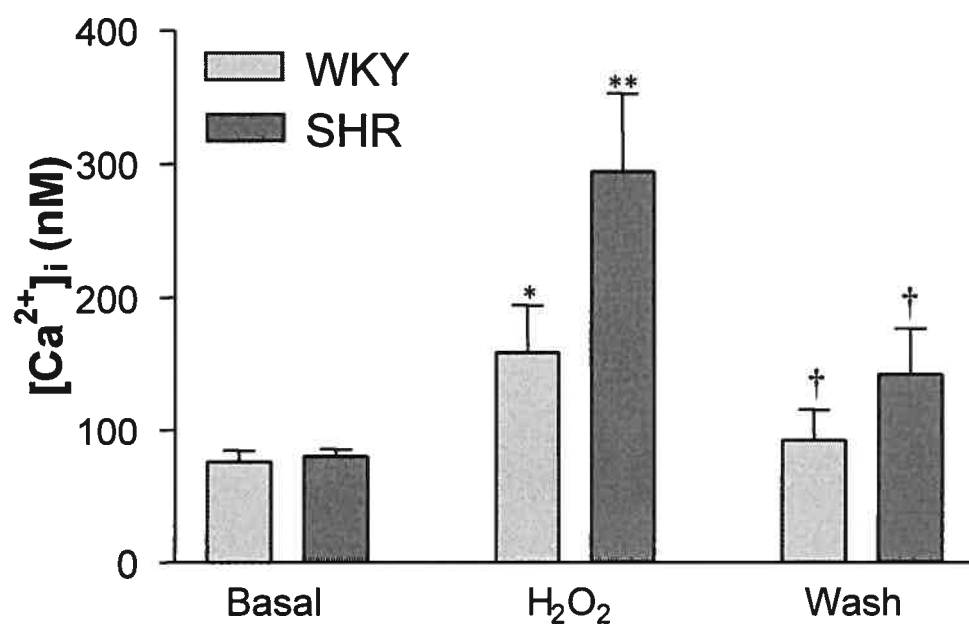
Figure 2

Figure 3

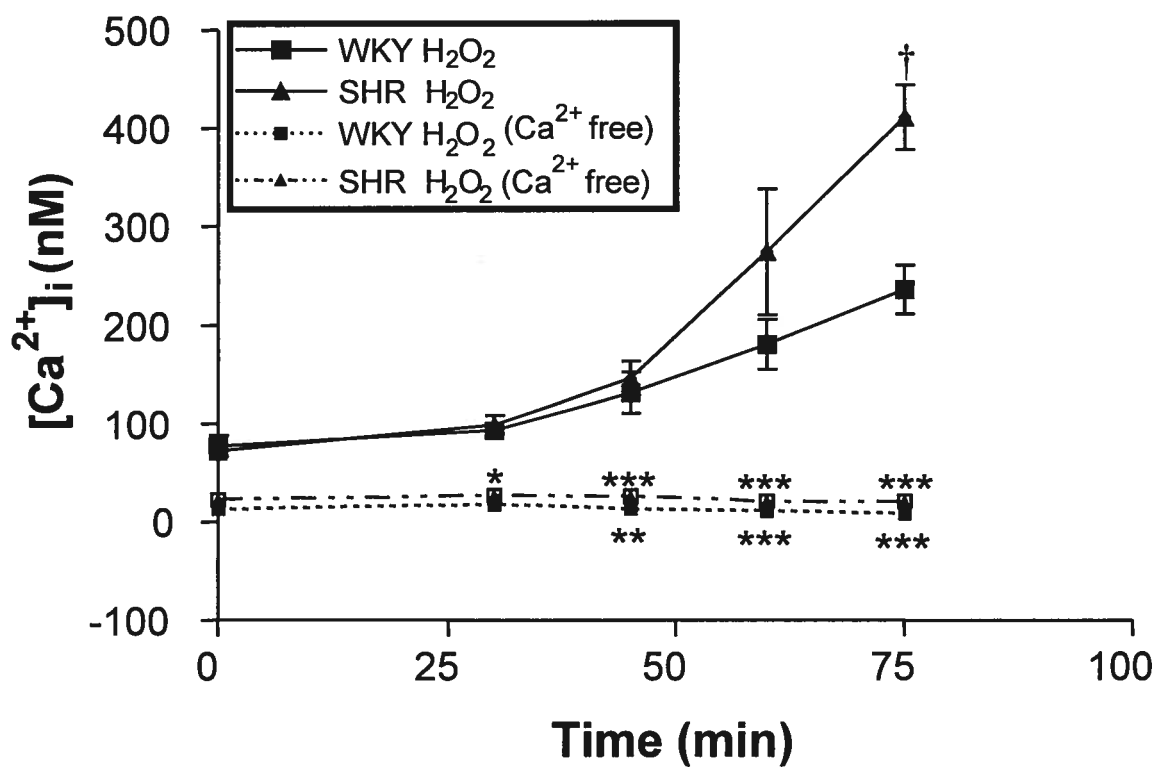
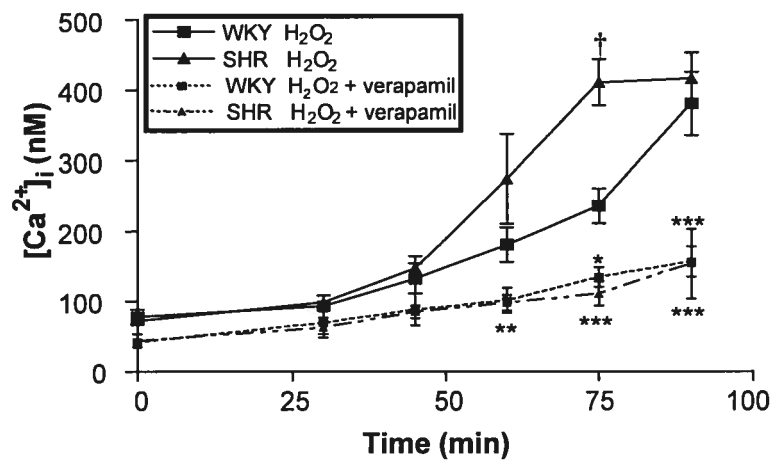
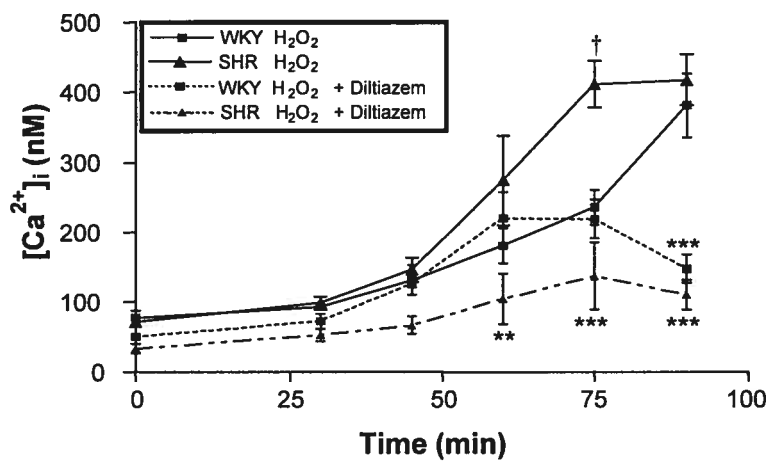


Figure 4

A



B



C

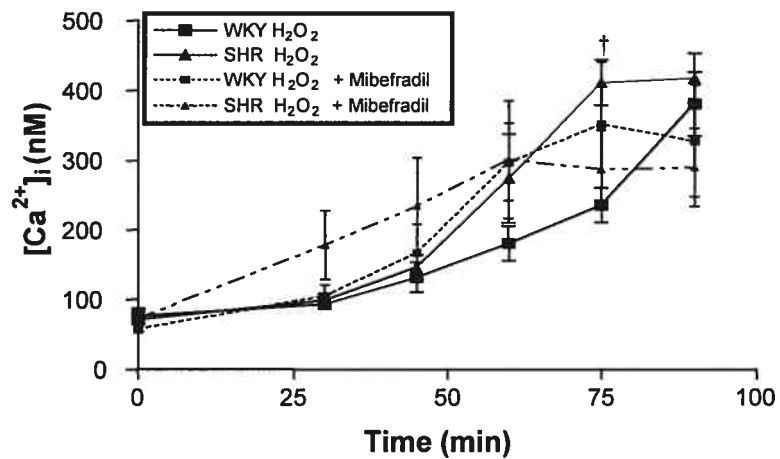


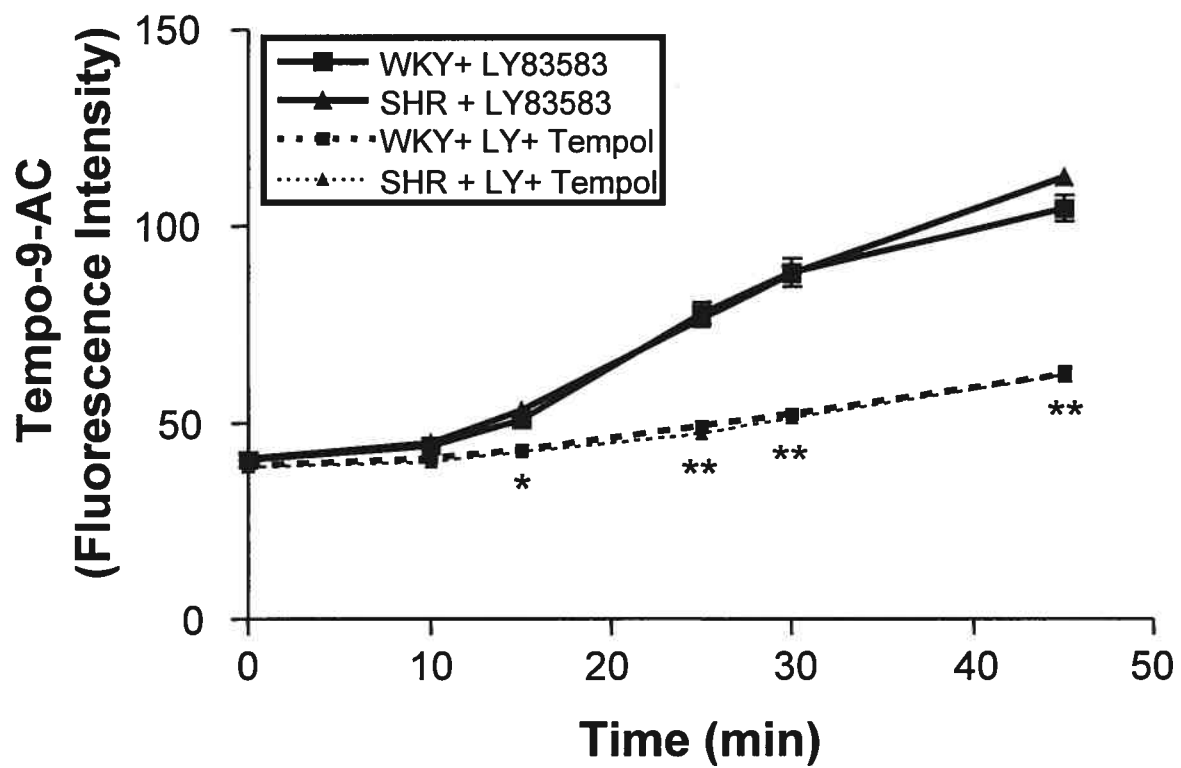
Figure 5

Figure 6

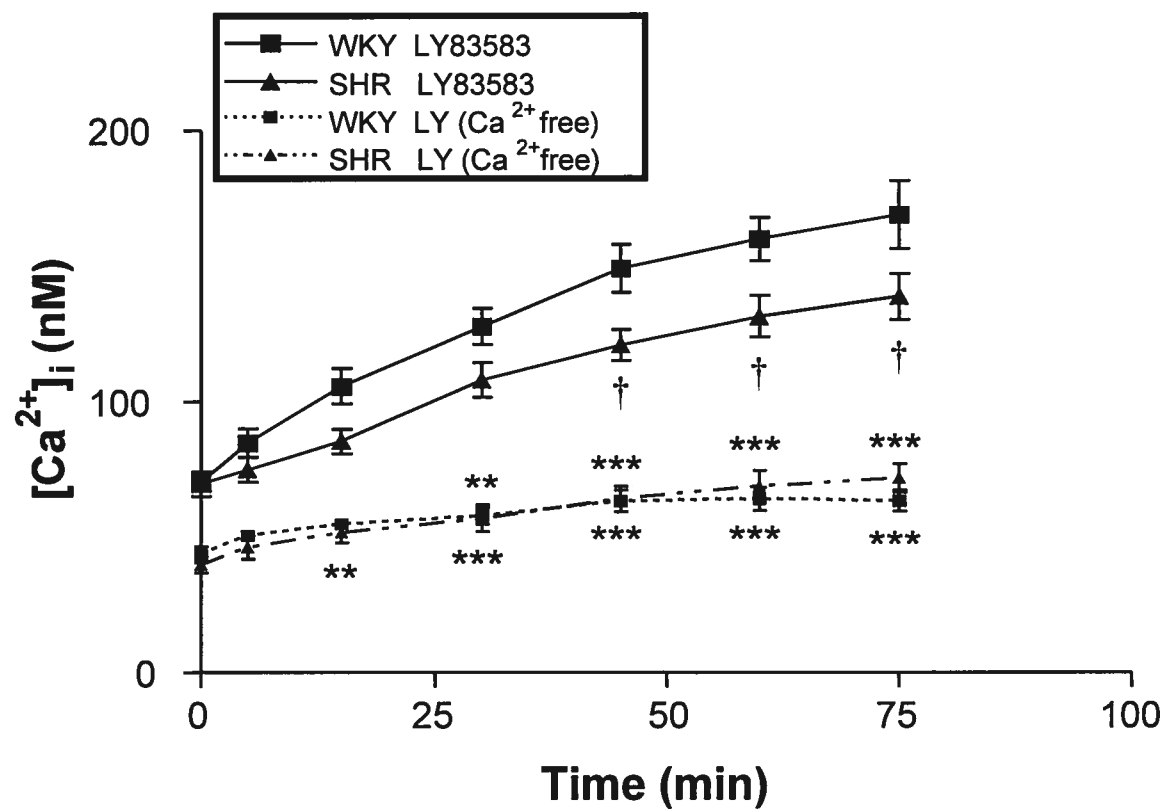
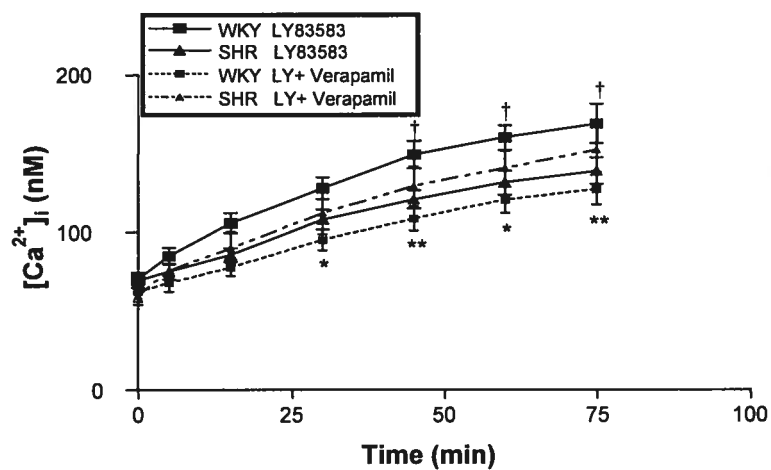
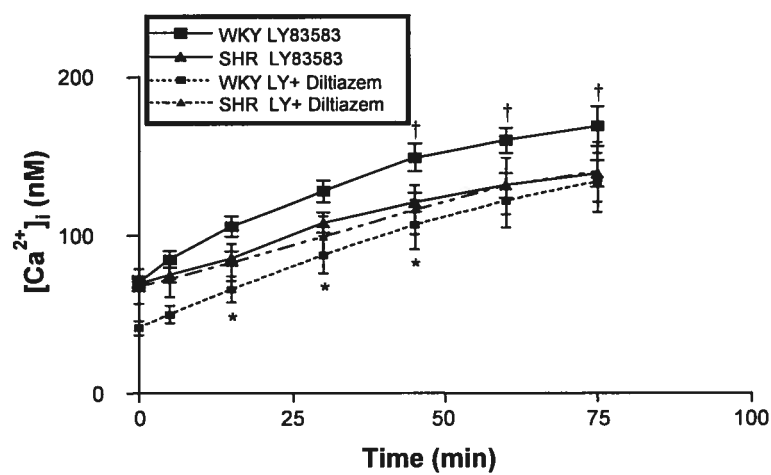


Figure 7

A



B



C

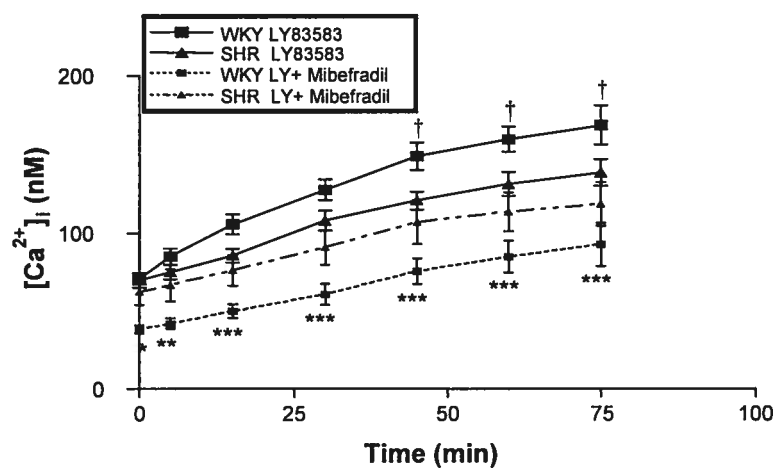
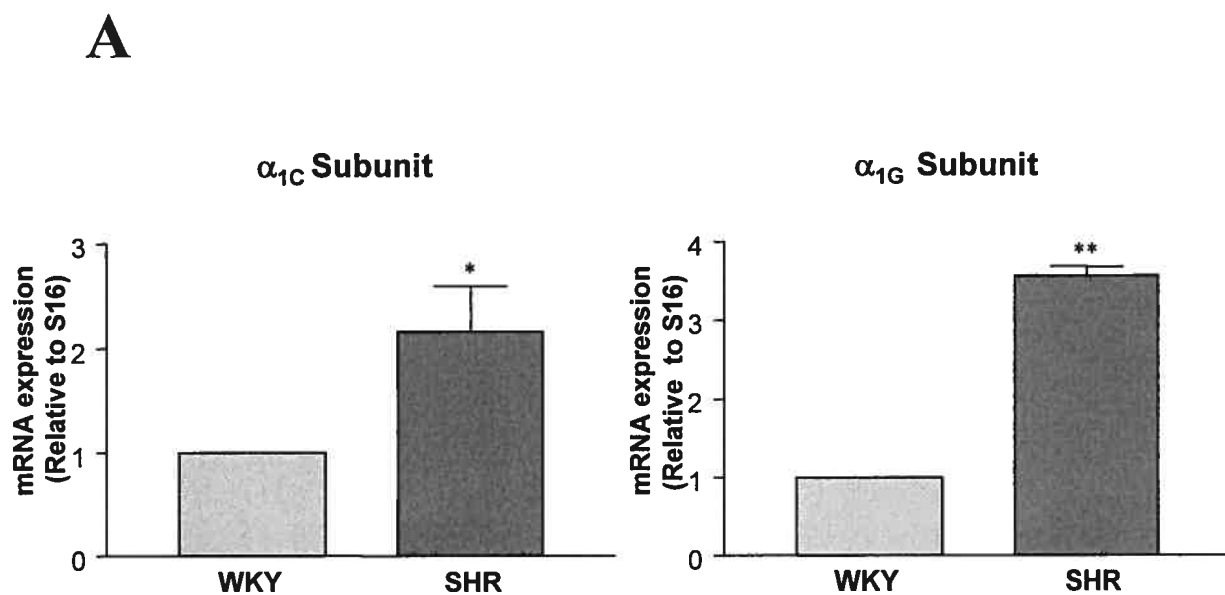


Figure 8



B

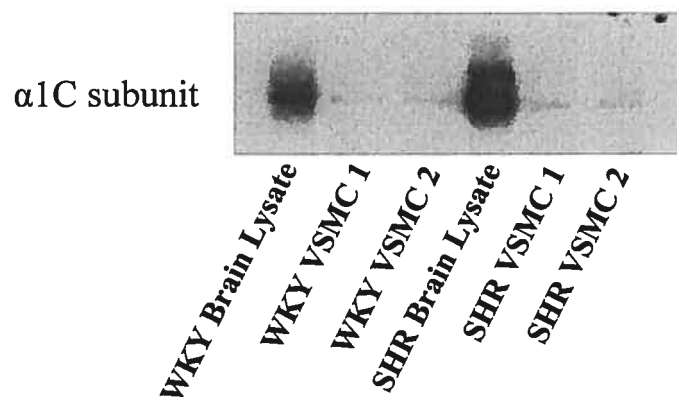
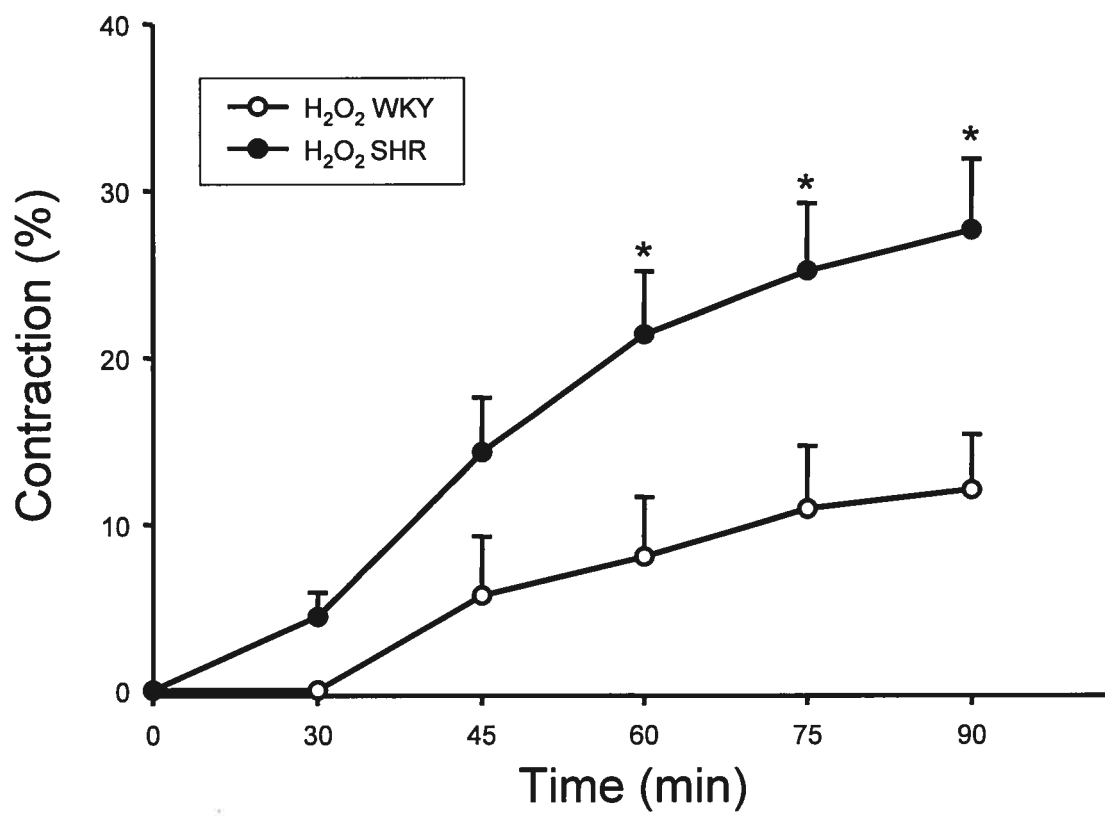


Figure 9



CHAPITRE 6

**MAP kinase Activation by H₂O₂ is Mediated Through
Tyrosine Kinase-dependent, PKC-independent Pathways in
Vascular Smooth Muscle Cells – Upregulation in SHR**

**MAP kinase Activation by H₂O₂ is Mediated Through Tyrosine
Kinase-dependent, PKC-independent Pathways in Vascular Smooth
Muscle Cells – Upregulation in SHR**

Fatiha Tabet B.Sc., Ernesto L. Schiffrin MD. PhD, Rhian M. Touyz MD. PhD
Multidisciplinary Research Group on Hypertension, Clinical Research Institute of
Montreal, University of Montreal, Quebec, Canada

Short title: Reactive oxygen species and MAP kinases signaling

Key words: Vascular smooth muscle cells, ERK1/2, p38MAP kinase, hydrogen peroxide, receptor tyrosine kinases, non-receptor tyrosine kinases.

6.1 ABSTRACT

We investigated putative molecular mechanisms underlying MAP kinase activation by H_2O_2 in vascular smooth muscle cells (VSMC) and evaluated whether H_2O_2 -induced actions are altered in VSMCs from spontaneously hypertensive rats (SHR). VSMCs from mesenteric arteries of Wistar Kyoto rats (WKY) and SHR were stimulated with H_2O_2 (2-30 minutes). Phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase was determined by immunoblotting. Involvement of tyrosine kinase and protein kinase C (PKC) was evaluated using pharmacological inhibitors, tyrphostin (A23 and A9) and GF109203X respectively. The role of receptor tyrosine kinases (RTK), was assessed with AG1478, AG1296 and AG1024, selective inhibitors of EGFR, PDGFR and IGF1R respectively. Non-receptor tyrosine kinases (NRTK) were studied using AG490 (JAK2 inhibitor) and PP2 (Src inhibitor). H_2O_2 stimulated phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase in a time-dependent manner. This increase was significantly greater in SHR versus WKY ($p < 0.01$). Activation of MAP kinases was unaffected by GF109203X but was decreased by tyrphostins ($p < 0.01$). Inhibition of NRTKs attenuated H_2O_2 -mediated phosphorylation of ERK1/2 ($p < 0.001$) but not of p38MAP kinase, whereas Src and JAK2 inhibition significantly decreased phosphorylation of both MAP kinases ($p < 0.01$). These data indicate that H_2O_2 increases ERK1/2 and p38MAP kinase activation through tyrosine kinase-dependent, PKC-independent mechanisms. Whereas ERK1/2 is regulated by both RTKs and NRTKs, p38MAP kinase is regulated by NRTKs. Our findings identify an important role for tyrosine kinases, but not PKC, in H_2O_2 -induced phosphorylation of ERK1/2

and p38MAP kinase in VSMCs. Upregulation of these processes may contribute to enhanced redox-dependent MAP kinase signaling in SHR VSMCs.

6.2 INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), including superoxide anion ($\bullet\text{O}_2^-$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), have key roles in regulating vascular smooth muscle cell (VSMC) growth, differentiation, migration and inflammation (1-5). Redox mechanisms underlying these events probably occur through activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases (2,4,6,7). MAP kinases comprise a family of ubiquitous protein-serine/threonine kinases, which participate in signaling cascades that control numerous cellular processes. Of the major mammalian MAP kinases, extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), p38MAP kinase, c-Jun N-terminal kinases (JNK) and ERK5 are the best characterized. ERK1/2, phosphorylated by MEK1/2 (MAP/ERK kinase), is a major growth signaling kinase, whereas p38MAP kinase and JNK, phosphorylated by MEK3/6 and MEK4/7 respectively influence cell survival, apoptosis, differentiation, and inflammation (8). ERK5, regulated by MEK5, is involved in protein synthesis, cell cycle progression and cell proliferation (9-11). Enhanced activation of vascular MAP kinases has been demonstrated in various models of hypertension and has been implicated in hypertensive vascular remodeling and target-organ damage (12,13). Increasing evidence indicates that these kinases are activated by ROS or by a mild oxidative shift to the intracellular thiol/disulfide redox state (6,14,15). Although MAP kinases are regulated by oxygen free radicals, they are probably not direct substrates of $\bullet\text{O}_2^-$ and H_2O_2 .

Exact mechanisms whereby ROS influence MAP kinase activity remain unclear. However activation of tyrosine kinases and protein kinase C (PKC) may be important, since these molecules are redox-sensitive and are upstream of MAP kinases

(8). Receptor tyrosine kinases (RTK), such as platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), epidermal growth factor receptor (EGFR) and insulin-like growth factor receptor (IGFR), non-receptor tyrosine kinases (NRTK), such as JAK2 and Src, and various isoforms of PKC have been demonstrated to be targets of ROS (16-19).

In the present study we questioned the role of tyrosine kinases and PKC in the activation of ERK1/2 and p38MAP kinase by H_2O_2 in VSMCs. In addition we sought to evaluate whether redox-sensitive activation of these MAP kinases, important in growth and pro-inflammatory signaling in VSMCs, is differentially regulated in cells from spontaneously hypertensive rats (SHR). Of the many ROS, we studied H_2O_2 because H_2O_2 is cell-membrane permeable, it is a more stable ROS than $\bullet O_2^-$ or OH^- , and it plays an important role in intracellular signaling.

6.3 METHODS

Animals

The Study was approved by the Animal Ethics Committee of the Clinical Research Institute of Montreal (IRCM) and carried out according to recommendations of the Canadian Council of Animal Care. Sixteen-week-old male Wistar-Kyoto rats (WKY) and SHR (n=10/group) (Taconic Farms Inc. Germantown, N.Y.) were studied. Rats were killed by decapitation.

Cell Culture

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) derived from mesenteric arteries were isolated and characterized as described previously (20,21). Briefly, mesenteric arteries were cleaned of adipose and connective tissue and VSMCs were dissociated by enzymatic digestion of vascular arcades. The tissue was filtered and the cell suspension centrifuged and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), HEPES, L-glutamine, penicillin, and streptomycin. VSMCs were cultured in DMEM containing 10% FBS and maintained at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂/95% air). Early passaged cells (passages 3 to 6) were used. Before experimentation, cells were rendered quiescent by serum deprivation for 24 hours.

Western Blot Analysis of MAP kinases

Quiescent VSMCs were stimulated and then washed with cold PBS. Lysis buffer (Na pyrophosphate 50 mmol/L, NaF 50 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na₃VO₄ 2 mmol/L, HEPES pH 7.4, 10 mmol/L, Triton X-100 0.1%, PMSF 50 mmol/L, pepstatin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, aprotinin 1 µg/ml) was

added. Plates were placed on dry ice for 5 min and allowed to thaw. Cells were scraped off and sonicated for 5 sec. The protein supernatant was separated by centrifugation and protein concentrations were determined with the Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Equal amount of proteins were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (Boehinger, Mannheim, Laval, Quebec, Canada) for 1h at 100 V. Membranes were blocked with blocking buffer, containing tris-buffered saline, 0.1% Tween-20 with 5% w/v non-fat dry milk for 1h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with anti-phospho-specific ERK1/2 antibody (Thr202/Tyr204) and anti-phospho-specific p38MAP kinase antibody (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) (1:1000). Membranes were then incubated with secondary antibodies (1:2000) for 1h at room temperature and incubated with Blotting Substrate (Roche, Indianapolis, IN) following the manufacture's protocol. Membranes were re-incubated with anti- α actin antibody. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence, exposed to film and blots analyzed densitometrically (Image-Quant software, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Experimental protocol

Cells were stimulated with H₂O₂ for 2-30 minutes. H₂O₂ was used at 10⁻⁴ mol/L, since we and others previously reported maximal effects at this concentration (22). The role of tyrosine kinases and PKC in MAP kinase phosphorylation was determined using selective pharmacological inhibitors, Tyrphostin A23 (10⁻⁵ mol/l) and GF109203X (10⁻⁵ mol/l) respectively. To assess whether H₂O₂-induced ERK1/2 and p38MAPK activation is mediated via EGFR kinase, PDGFR kinase or IGFR kinase, we used the selective inhibitors AG1478, AG1296 and AG1024 (10⁻⁵ mol/L)

respectively. Finally, to determine the role of the NRTKs in the activation of ERK1/2 and p38MAP kinase, selective inhibitors of Src (PP2) and JAK2 (AG490) (10^{-5} mol/L) were used. PP3, an inactive analogue was used as a negative control. Previous studies demonstrated that at the doses used, the pharmacological agents are selective (23). VSMCs were pre-treated with pharmacological inhibitors for 30 minutes prior to H_2O_2 addition.

Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times. Results are presented as means \pm SEM and compared by analysis of variance. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

6.4 RESULTS

Effect of H₂O₂ on ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in VSMCs from WKY and SHR.

H₂O₂ stimulation resulted in a slow and sustained increase in ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in WKY and SHR VSMCs. Maximal responses were obtained within 10 to 20 min after H₂O₂ stimulation (Fig. 1). H₂O₂-mediated effects were significantly greater in cells from SHR compared with WKY (p<0.01).

Activation of ERK1/2 and p38MAP kinase by H₂O₂ is PKC-independent and tyrosine kinase-dependent.

To determine whether PKC is an upstream regulator of H₂O₂-induced activation of ERK1/2 and p38MAP kinase, cells were treated with GF109203X, a selective PKC inhibitor. Phosphorylation of both MAP kinases was not significantly altered by GF109203X (Fig. 2), suggesting that pathways other than PKC regulate H₂O₂-induced phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase in VSMCs. To verify the functional integrity of ERK1/2 and p38MAP kinase pathways, we also examined effects of SB202190, selective p38MAP kinase inhibitor, and PD98059, selective inhibitor of ERK1/2 pathway. SB202190 and PD98059 abrogated H₂O₂-induced phosphorylation of p38MAP kinase and ERK1/2 respectively. Neither GF109203X, PD98059 nor SB202190 influenced basal phosphorylation of MAP kinases.

To evaluate the role of protein tyrosine kinases in H₂O₂-mediated activation of MAP kinases, VSMCs were exposed to two different protein tyrosine kinases inhibitors, tyrphostin A9 and tyrphostin A23. Pretreatment of cells with tyrphostins significantly attenuated phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase (fig. 3).

Neither Tyrphostin A9 nor Tyrphostin A23 influenced basal MAP kinase phosphorylation.

Role of EGFR, PDGFR and IGFR tyrosine kinases in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H₂O₂

To test whether RTKs are involved in H₂O₂-induced MAP kinase activation, we pre-treated VSMCs with AG1478, AG1296 and AG1024, specific inhibitors of EGFR, PDGFR and IGFR respectively. AG1478, AG1296 and AG1024 significantly reduced H₂O₂-mediated activation of ERK1/2 in SHR and WKY VSMCs (Figs. 4B and 5B) but did not influence p38MAP kinase phosphorylation (Figs. 4A and 5A). Although these RTK inhibitors attenuated H₂O₂-induced ERK1/2 phosphorylation, effects were not completely abolished, indicating that H₂O₂ activates ERK1/2 only in part through RTKs.

Non-receptor tyrosine kinases, Src and JAK2, are implicated in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H₂O₂

As shown in figure 5, AG490, selective JAK2 inhibitor, significantly reduced phosphorylation of ERK1/2 ($p < 0.01$) and p38MAP kinase ($p < 0.05$). Similar results were obtained with the specific Src inhibitor, PP2 (Fig. 6). Pretreatment of cells with PP2 reduced H₂O₂-mediated activation of EKR1/2 and p38MAP kinase. PP3, inactive analogue, was used as a negative control and did not influence MAP kinase phosphorylation by H₂O₂ (Fig.6).

6.5 DISCUSSION

Major findings from the present study demonstrate that H_2O_2 induces activation of ERK1/2 and p38MAP kinase through tyrosine kinase-dependent, PKC-independent pathways in VSMCs. ERK1/2 and p38MAP kinase are differentially regulated by H_2O_2 since both RTKs and NRTKs influence ERK1/2 activation whereas only NRTKs are implicated in p38MAP kinase phosphorylation. VSMCs from SHR exhibited enhanced H_2O_2 -mediated MAP kinase activation, indicating hyperresponsiveness of redox-sensitive vascular processes. Our findings underscore the importance of tyrosine kinases, but not of PKC, in ROS regulation of ERK1/2 and p38MAP kinase in VSMCs. Upregulation of these redox-dependent processes in SHR may contribute to ERK1/2- and p38MAP kinase-related VSMC growth and inflammation in hypertension.

Reactive oxygen species activate MAP kinases in many cell types (24-30). Our results demonstrate that H_2O_2 induces a time-dependent increase in phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase in mesenteric VSMC, with enhanced responses in SHR. H_2O_2 was used at a concentration of 10^{-4} mol/L, which we previously demonstrated, from full dose-response curves, yields maximal responses (22). Although this dose is not a physiological concentration, under pathological conditions, such as in ischemia-reperfusion injury and in vascular damage associated with hypertension, diabetes and atherosclerosis, vascular H_2O_2 can increase to levels within the μ molar range (31-33). MAP kinase effects were not immediate, but were slow and sustained, particularly in SHR cells, with maximal activation occurring after 10 minutes stimulation. This temporal pattern may reflect the time for cell membrane permeabilization of exogenously added H_2O_2 and/or the possibility that H_2O_2 -induced

MAP kinase responses only become evident once intracellular antioxidant systems have been saturated. Not all studies demonstrated activation of MAP kinases by ROS. In rat aortic smooth muscle cells, ROS did not influence ERK1/2 phosphorylation (24), and in Ang II-stimulated VSMCs only p38MAP kinase was activated by ROS (6,14,27). These discrepancies may relate to differences in the species of oxygen free radicals generated, the concentration of ROS and intracellular compartmentalization of ROS. Enhanced activation of MAP kinases by H₂O₂ in SHR could have important functional consequences since oxidative stress is increased in SHR VSMCs (34-36) and because ERK1/2 and p38MAP kinase are critically involved in VSMC growth and inflammation (8,37).

Molecular mechanisms underlying H₂O₂-stimulated activation of MAP kinases in VSMCs have not been fully elucidated. ROS may influence MAP kinases directly through oxidation/reduction of MAP kinases themselves, or indirectly through upstream regulators, such as PKC, tyrosine kinases and protein phosphatases. Here we evaluated the role of PKC and tyrosine kinases using a pharmacological approach.

PKC, a ubiquitously expressed family of kinases, comprise at least 12 isoforms (38,39). PKC regulates many signaling molecules including MAP kinases (40). Activation of PKC is redox-sensitive in some, but not all, cell types and sensitivity to ROS appears to depend on specific isozymes. In the present study, GF109203X, selective PKC inhibitor, did not alter H₂O₂-induced phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase, indicating that MAP kinase regulation by ROS in VSMCs occurs through PKC-independent pathways. In support of our findings, others reported that GF109203X does not block H₂O₂-induced Akt activation in VSMCs (41) and in A10 VSMCs, PKC is an upstream modulator of increased ERK1/2 phosphorylation, but

not of p38MAP kinase in response to H₂O₂ (40). However, many studies reported that PKC is an important intermediate in MAP kinase stimulation by ROS (28,42). Possible reasons for these conflicting results may be due to differential regulation in different cell types and to variable activation of PKC isoforms by different species of free radicals.

Whereas PKC inhibition did not alter MAP kinase status, inhibition of tyrosine kinases with two different tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin A9 and A23, markedly reduced H₂O₂-induced phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase, indicating the importance of tyrosine kinases in MAP kinase activation by ROS in mesenteric VSMCs. To investigate in greater detail which of the many tyrosine kinases are involved, we used selective inhibitors of RTKs (EGFR, IGFR, PDGFR) and NRTKs (Src and JAK2). Previous studies demonstrated that RTKs are targets of ROS and that activated tyrosine kinases in turn stimulate generation of ROS through activation of NAD(P)H oxidase (6,16,17). We and others reported that Ang II activates MAP kinases in VSMCs through redox-sensitive pathways involving EGFR and IGFR transactivation (6). Saito et al (43) reported that PDGFR is activated by ligand-independent trans-activation through H₂O₂. Here we show that selective inhibitors of EGFR, PDGFR and IGFR attenuate H₂O₂-induced activation of ERK1/2, but not of p38MAP kinase. These findings suggest that ERK1/2, but not p38MAP kinase, is regulated by redox-sensitive activation of RTKs. On the other hand, inhibition of the NRTKs, Src and JAK2, significantly attenuated both ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in WKY and SHR cells. Mechanisms whereby ROS-regulated Src and JAK2 influence MAP kinases may involve common targets upstream of MAP kinases. Although it is beyond the scope of the present study to

identify such targets, but possible candidates include protein phosphatases (44), since 1) these molecules are directly regulated by oxidation/reduction through protein modification of cysteine residues, 2) protein phosphatases are downstream of tyrosine kinases, and 3) MAP phosphatases are upstream modulators of ERK1/2 and p38MAP kinase. These aspects await further clarification.

In conclusion, we demonstrate that in VSMCs H_2O_2 induces phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase through tyrosine kinase-dependent, PKC-independent pathways. Whereas NRTKs are important in p38MAP kinase activation by H_2O_2 , both RTKs and NRTKs are important in ERK1/2 activation. Upregulation of H_2O_2 -mediated MAP kinase stimulation may contribute to enhanced signalling by ERK1/2 and p38MAP kinase in SHR. Our findings highlight the key role of tyrosine kinases, rather than PKC, in redox activation of MAP kinases and add new mechanistic insights into MAP kinase signalling associated with enhanced ROS action in hypertension.

6.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by grant 44018 and a group grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). F Tabet received a fellowship from the CIHR/Canadian Hypertension Society and from the Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. RM Touyz received a scholarship from the CIHR/Canadian Hypertension Society.

6.7 REFERENCES

- 1- Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2003; 1:91-106
- 2- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Griendling K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998; 32:488-495
- 3- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogenen expression. *Circ. Res.* 1992; 70:593-599
- 4- Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circ Res.* 2001; 89(1):39-46.
- 5- Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272 (30):18515-18517
- 6- Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signalling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2003; 81:159-167
- 7- Touyz RM, Schiffrin El. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122(4):339-52.
- 8- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22(2):153-83.

- 9- Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2001; 20(11):2757-67.
- 10- English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Bio Chem*. 1999; 274(44):31588-92
- 11- Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem*. 1996 ; 271(28):16586-90.
- 12- Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest*. 1996; 97(2):508-14.
- 13- Touyz RM, Deschepper C, Park JB, He G, Chen X, Neves MF, Viridis A, Schiffrin EL. Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2002; 20(6):1127-34.
- 14- Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(4):940-8.
- 15- Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL. Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol*. 1999; 277(2 Pt 1):L282-91.

- 16- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279(6):L1005-28.
- 17- Yang S, Hardaway M, Sun G, Ries WL, Key LL Jr. Superoxide generation and tyrosine kinase. *Biochem Cell Biol*. 2000; 78(1):11-7.
- 18- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82(1):47-95.
- 19- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002; 91(5):406-13.
- 20- Touyz RM, Tolloczko B, and Schiffrin EL. Mesenteric vascular smooth muscle cells from SHR display increased Ca^{2+} responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens*. 1994; 12:663-673.
- 21- Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance vessels. *Circulation*. 1999; 99(3):392-399.
- 22- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 44(2):200-8.
- 23- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000;351(Pt 1):95-105.
- 24- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1998; 273(24):15022-9.

- 25- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest.* 1997; 100(7):1813-21.
- 26- Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 1997; 80(3):383-92.
- 27- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 1996; 271(8):4138-42.
- 28- Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades RA. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19(2):324-32.
- 29- Abe MK, Chao TS, Solway J, Rosner MR, Hershenson MB. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994; 11(5):577-85.
- 30- Song HJ, Lee TS, Jeong JH, Min YS, Shin CY, Sohn UD. Hydrogen Peroxide-induced ERK Activation in Cultured Feline Ileal Smooth Muscle Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312(1):391-8.
- 31- Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(9):1362-1369.
- 32- Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol.* 1997; 272(5 Pt 1):L897-902.

- 33- Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem.* 1994; 269(39):24156-24162.
- 34- Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 35(5):1055-61.
- 35- Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2001; 38(6):1395-9.
- 36- Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(1):22-9.
- 37- Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci.* 2003; 8:d369-91.
- 38- Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci.* 2004;117:131-132.
- 39- Rybin VO, Guo J, Sabri A, Elouardighi H, Schaefer E, Steinberg SF. Stimulus-specific differences in protein kinase C delta localization and activation mechanisms in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004; 279(18):19350-61.
- 40- Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Distinct roles of Ca²⁺, calmodulin, and protein kinase C in H₂O₂-induced activation of ERK1/2, p38 MAPK, and protein

kinase B signaling in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2004; 6(2):353-66.

41- Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED. Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med*. 2003; 228(7):836-842.

42- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(8 Suppl 3):S227-32.

43- Saito S, Frank GD, Mifune M, Ohba M, Utsunomiya H, Motley ED, Inagami T, Eguchi S. Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src. *J Biol Chem*. 2002; 277(47):44695-700.

44- Rao RK, Clayton LW. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293(1):610-616.

6.8 LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Effect of H₂O₂ on ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in VSMCs from WKY and SHR rats. Top panels are representative immunoblots of p38MAP kinase (a) and ERK1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Membranes were probed with phospho-specific antibodies and re-probed with anti- α actin antibody to assess protein loading. Line graph demonstrates time-dependent effect of H₂O₂. Each data point is the mean \pm SEM of five experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WKY counterpart.

Figure 2. Activation of ERK1/2 and p38 MAP kinase by H₂O₂ is PKC-independent in VSMCs from WKY and SHR. Cells were pretreated with SB202190, GF109203X or PD98059 for 20-30 min before H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l, 10 min) addition. Top panels are representative immunoblots of p38MAP kinase (a) and ERK1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means \pm SEM of 5 experiments. *p<0.05, **p<0.001.

Figure 3. Role of tyrosine kinases in ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation by H₂O₂ in VSMCs from WKY and SHR rats. Cells were pretreated with Tyrphostin A9 or Tyrphostin A23 for 30 min before H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l, 10 min) addition. Top panels are representative immunoblots of p38MAP kinase (a) and ERK1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means \pm SEM of 5 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 4. Role of EGFR and PDGFR tyrosine kinases in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H₂O₂. Cells were pretreated with AG1478 or AG1296 for 30 min before H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l, 10 min) addition. Top panels are representative immunoblots of p38MAP kinase (a) and ERK1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of 5 experiments. *p<0.05, **p<0.001.

Figure 5. Role of JAK2 and IGF Receptor in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H₂O₂ in VSMCs from WKY and SHR rats. Cells were pretreated with AG490 or AG1024 for 30 min before H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l, 10 min) addition. Top panels are representative immunoblots of p38MAP kinase (a) and ERK1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of 5 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 6. Src family tyrosine kinases are implicated in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H₂O₂. Cells were pretreated with PP2 (Src inhibitor) or PP3 (inactive analogue) for 30 min before H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l, 10 min) addition. Top panels are representative immunoblots of p38MAP kinase (a) and ERK1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of 5 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 1

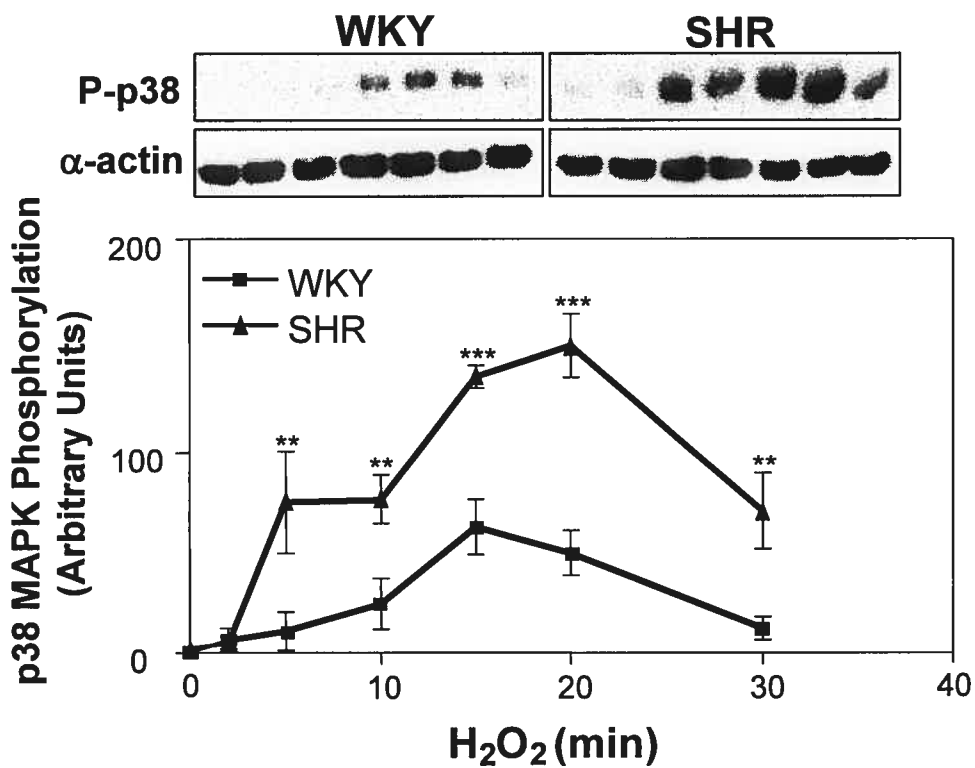
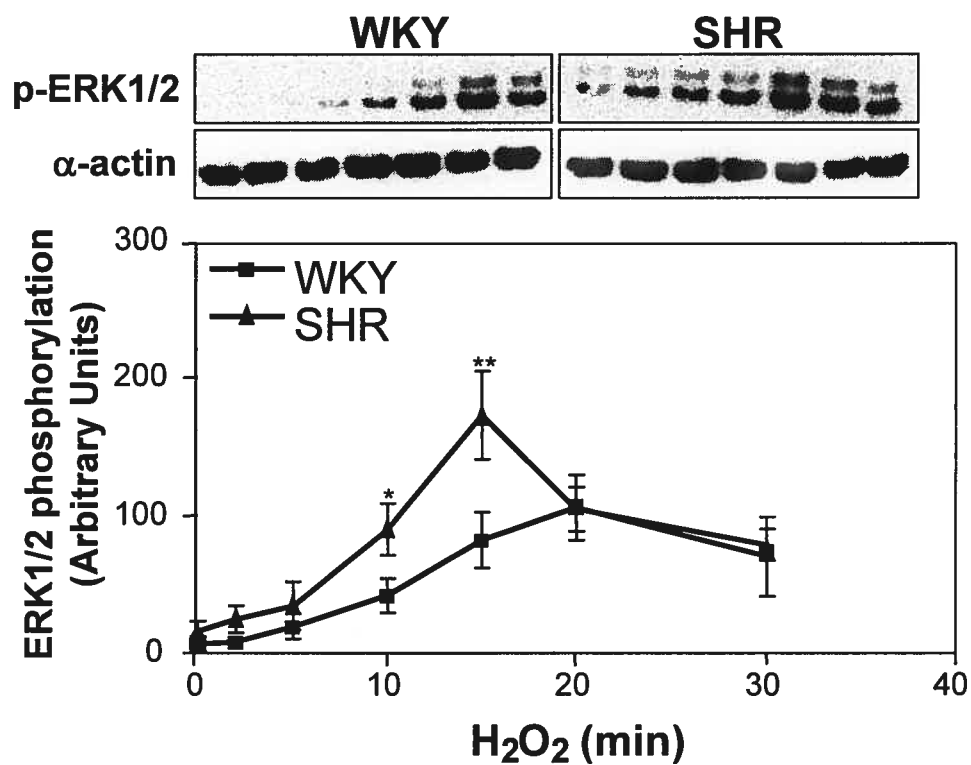
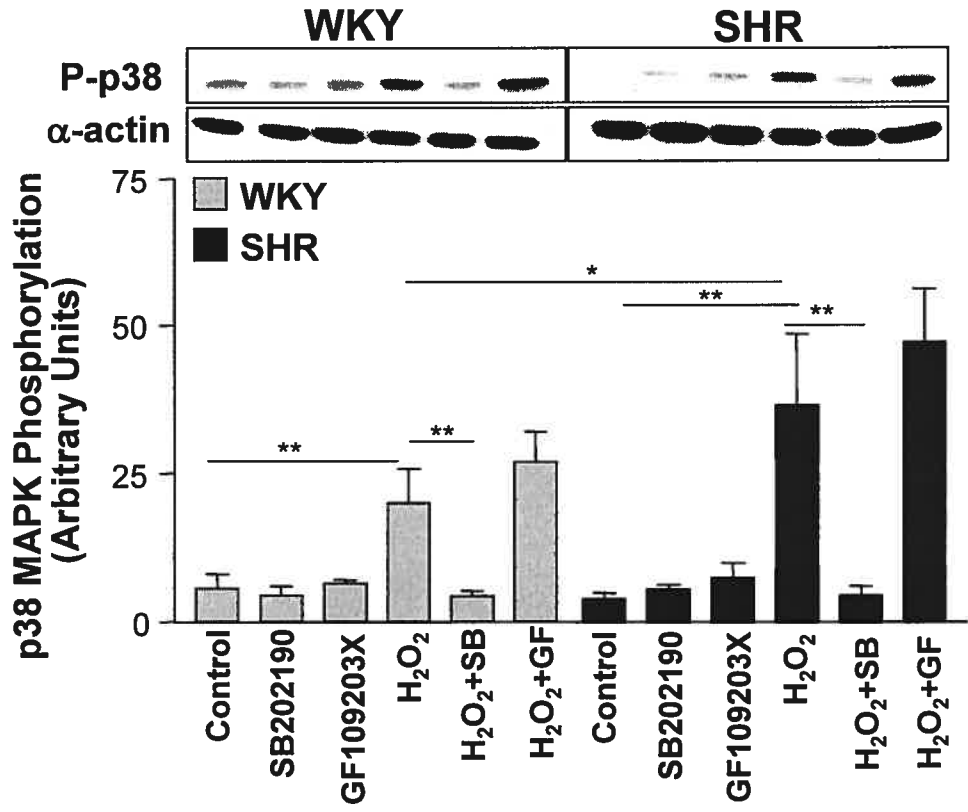
A**B**

Figure 2

A



B

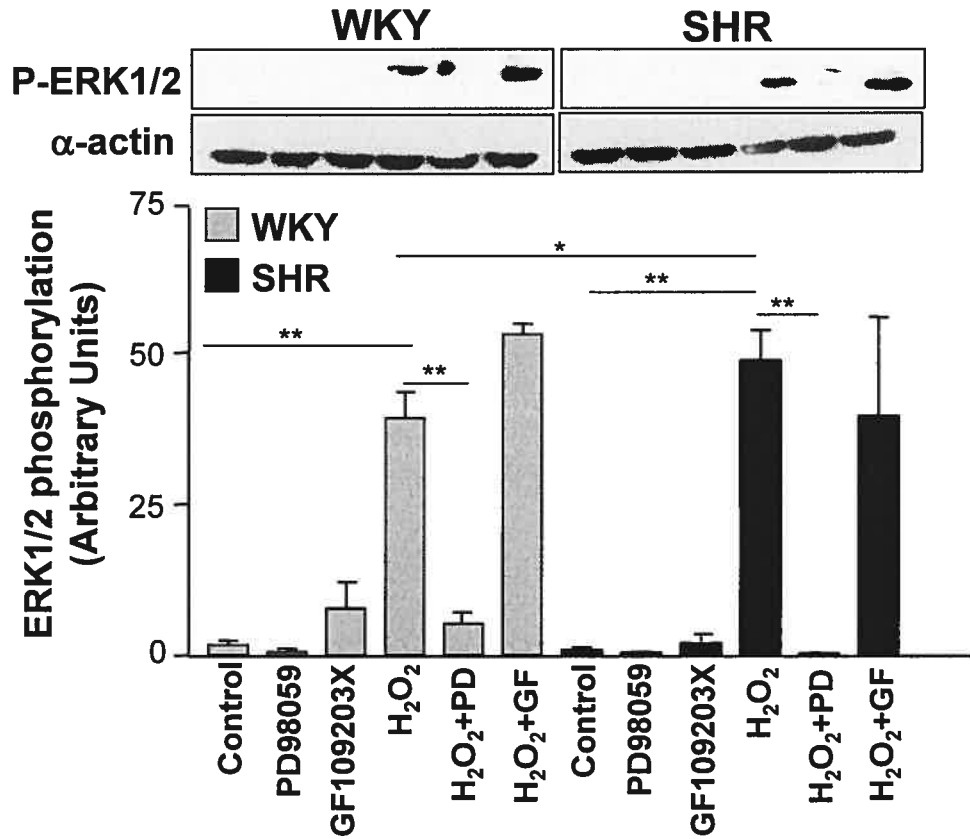


Figure 3

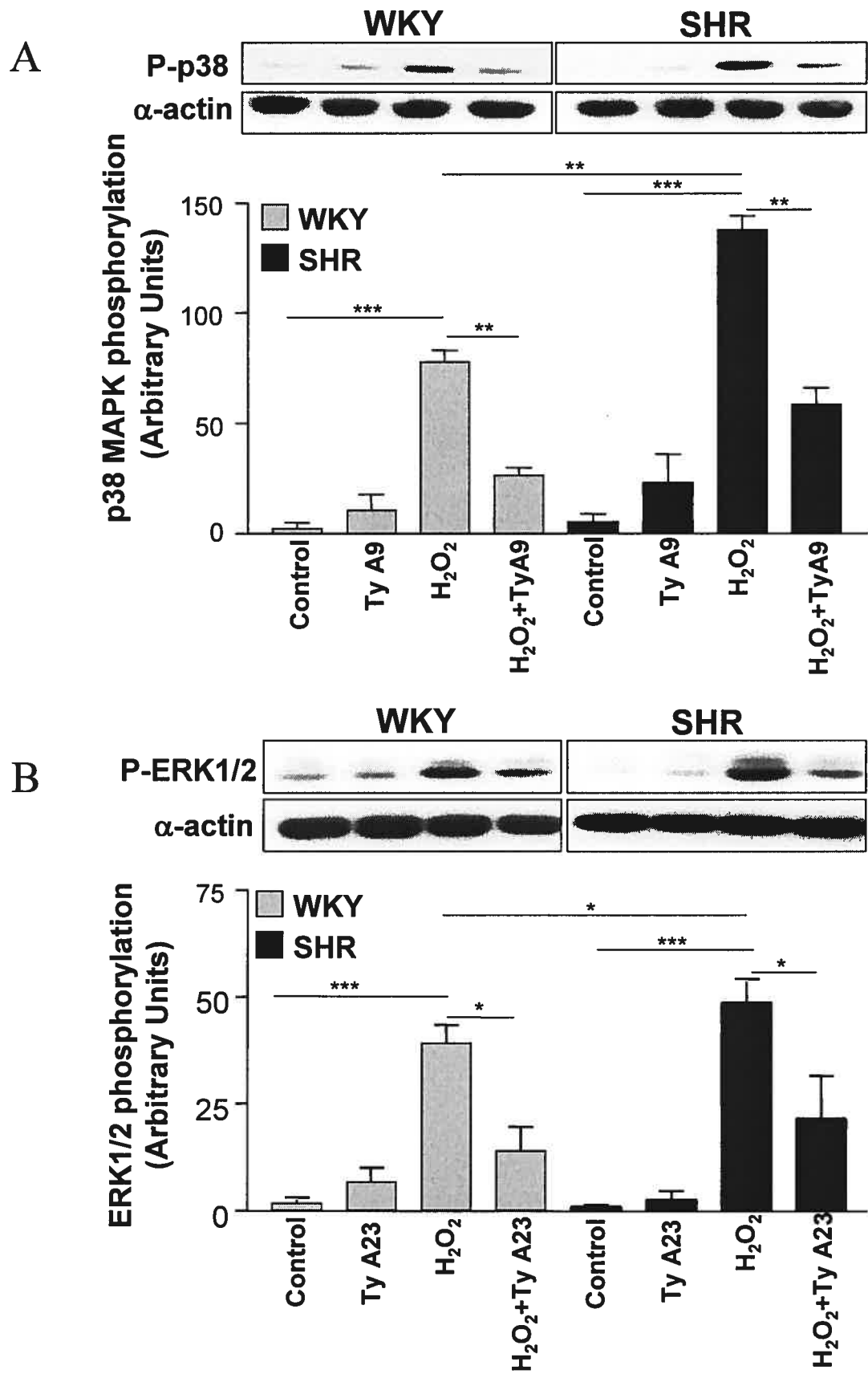
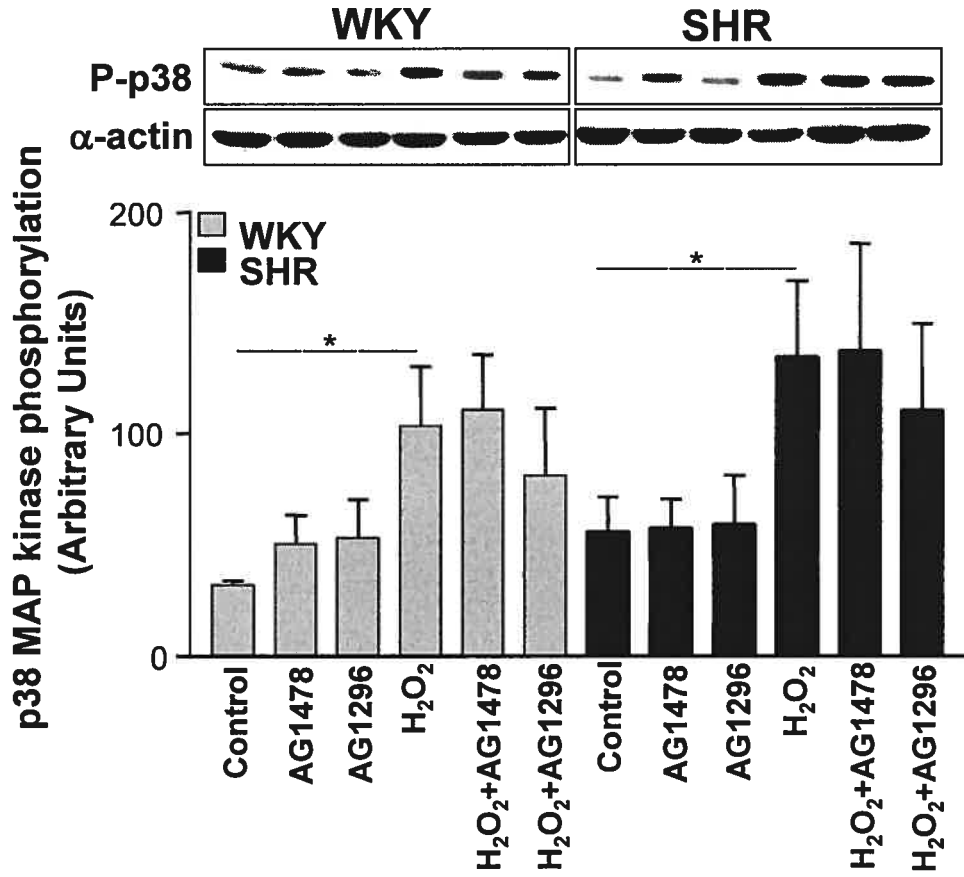


Figure 4

A



B

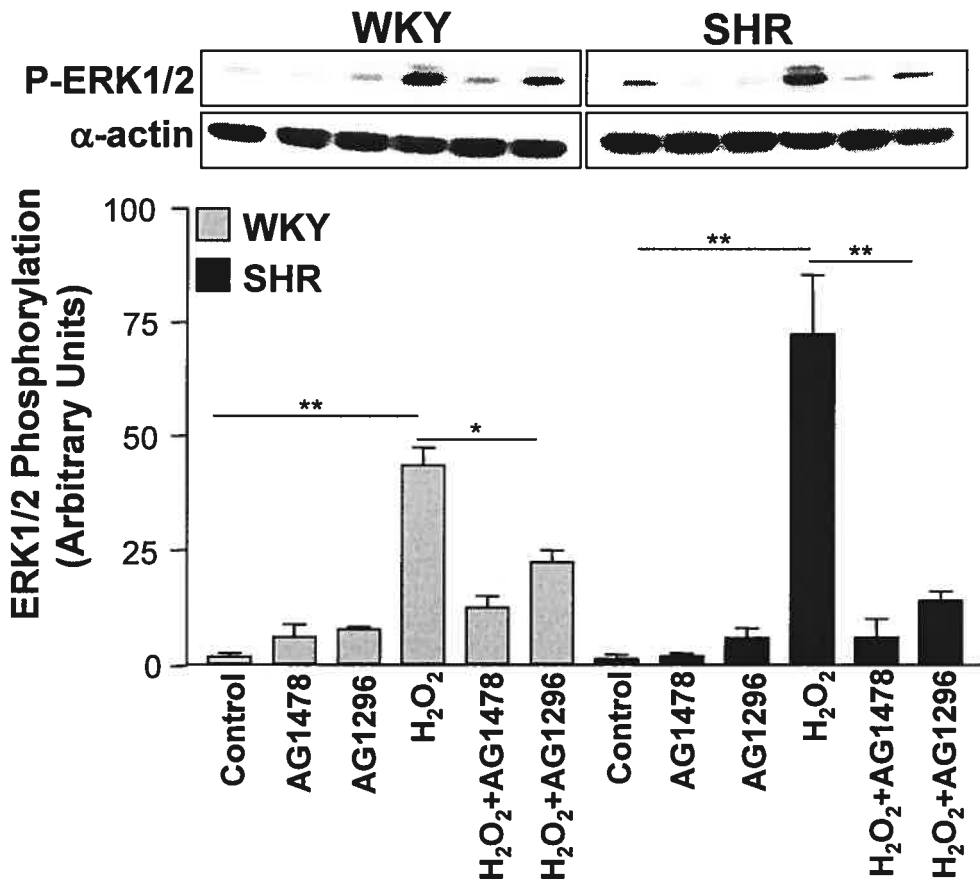
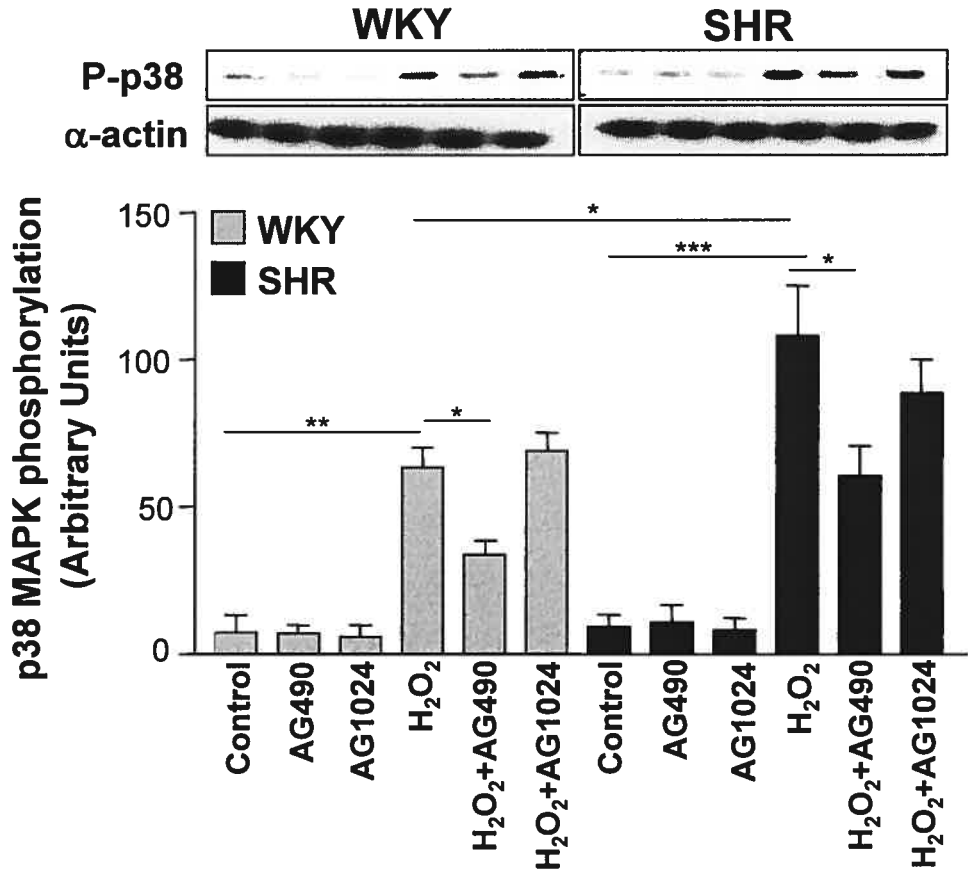


Figure 5

A



B

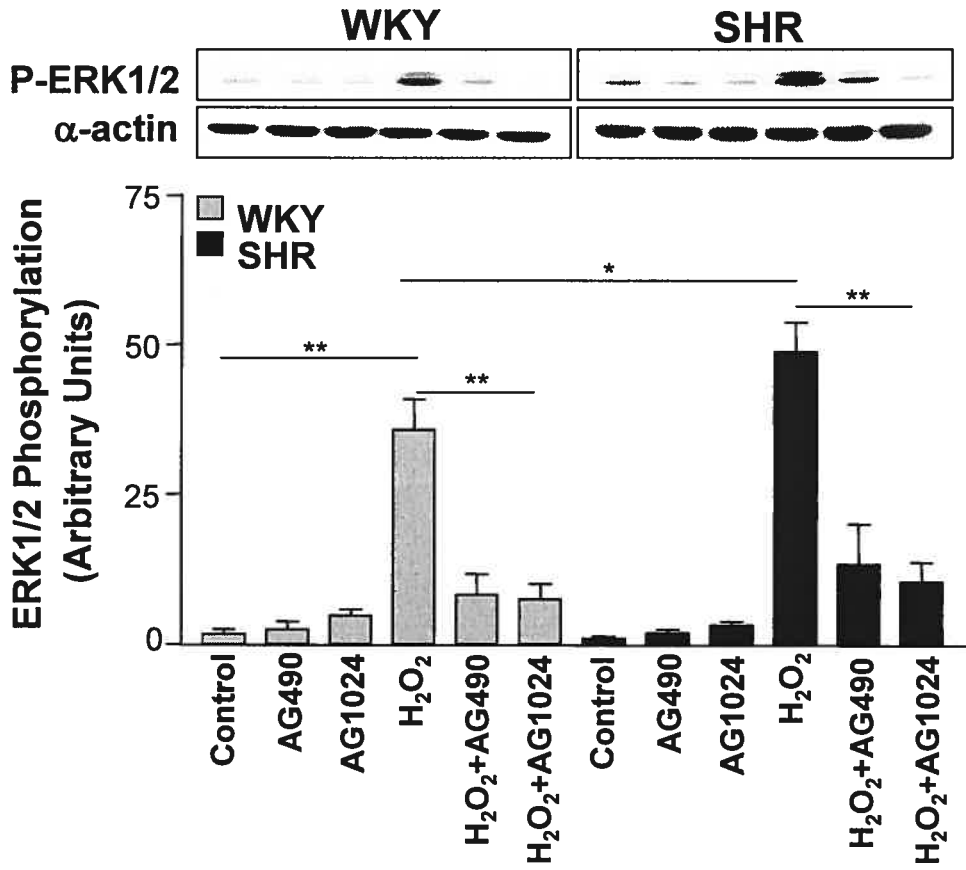
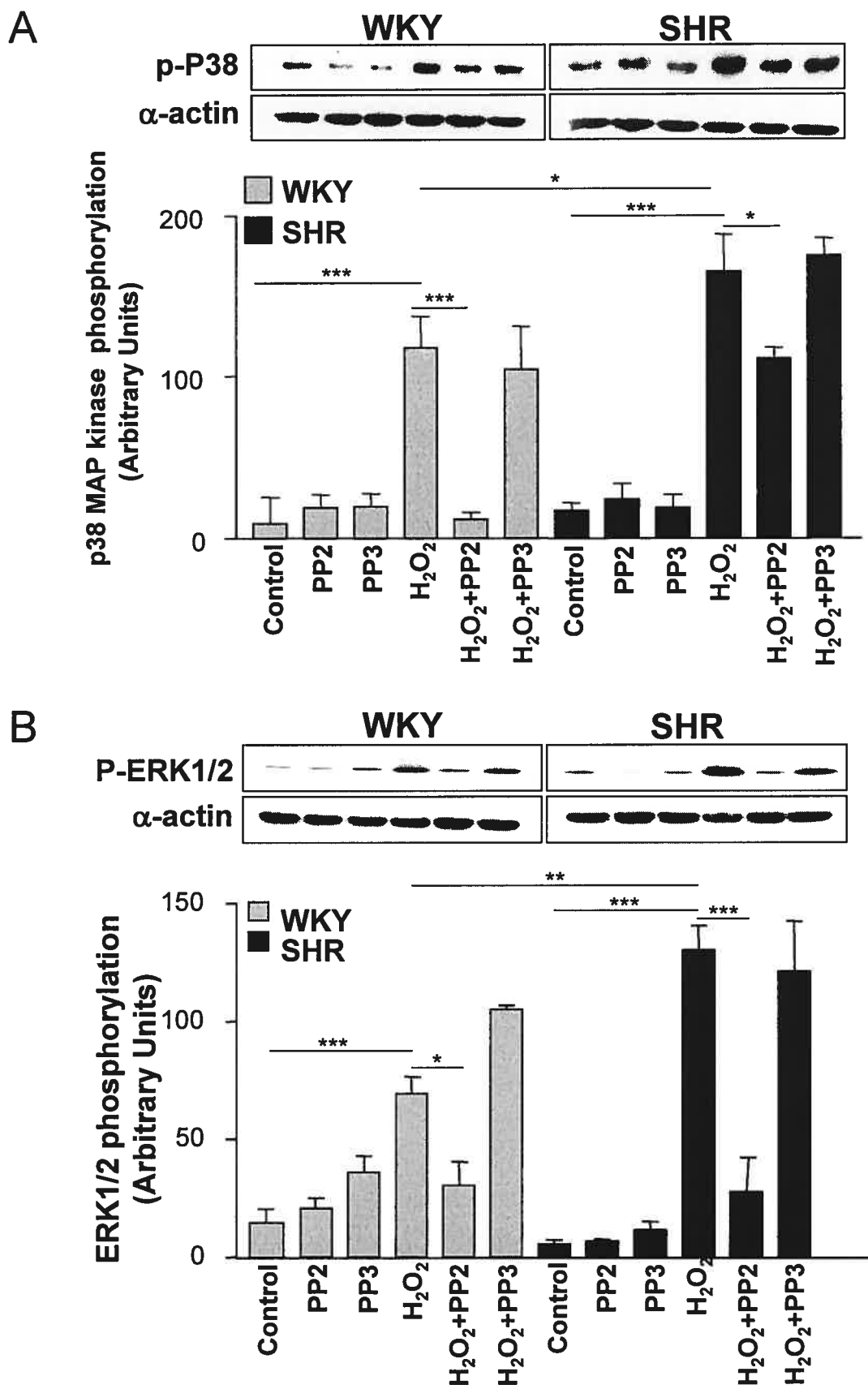


Figure 6



CHAPITRE 7

**Redox-sensitive Vascular Smooth Muscle Cell Signaling by
Angiotensin II Involves Oxidative Inactivation of Protein
Tyrosine Phosphatase SHP-2 – Dysregulation in
Hypertension**

7.1 ABSTRACT

We tested the hypothesis that Ang II induces phosphorylation of growth signaling kinases by oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatases (PTP) through redox-sensitive processes. We also assessed whether Ang II augments signaling in vascular smooth muscle cells (VSMC) from spontaneously hypertensive rats (SHR) versus Wistar Kyoto rats (WKY) through differential oxidation/inactivation of SHP-2. VSMCs from WKY and SHR were studied. SHP-2 expression and phosphorylation were evaluated by immunoblotting. The in-gel PTP assay and an antibody-based method were used to determine susceptibility of PTPs to oxidation. The functional significance of SHP-2 inactivation was evaluated by assessing Ang II-mediated growth signaling in SHP-2 knockdown cells (using siRNA). Ang II and H₂O₂ increased oxidation/inactivation of multiple PTPs. These effects were enhanced in SHR versus WKY ($p < 0.05$). One of the PTPs oxidized by Ang II was identified as SHP-2. Basal SHP-2 expression and activity were lower in SHR versus WKY ($p < 0.05$). Ang II increased SHP-2 phosphorylation in WKY ($p < 0.001$) and SHR ($p < 0.05$) with a lower magnitude of phosphorylation in SHR. Ang II-induced SHP-2 activation was mediated via AT₁R and NAD(P)H oxidase. SHP-2 knockdown resulted in increased AKT phosphorylation, without effect on ERK1/2 or p38MAPK. Our findings indicate that Ang II induces oxidative modification and inactivation of multiple PTPs in VSMCs. Effects involve AT₁R and NAD(P)H oxidase-driven generation of reactive oxygen species. In SHR, SHP-2 oxidative inactivation is increased and phosphorylation is blunted. These events are associated with augmented AKT signaling. Our findings identify PTPs as direct ROS targets in Ang II-stimulated VSMCs.

7.2 INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), ubiquitous reactive derivatives of O_2 metabolism that include superoxide anion ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl anion (OH^-), are produced primarily by non-phagocytic NAD(P)H oxidase in the vasculature. This enzyme is regulated by vasoactive peptides, such as angiotensin II (Ang II), growth factors and mechanical forces (1). Under pathological conditions, increased ROS production leads to vascular smooth muscle cell (VSMC) growth and inflammation, important in vascular damage associated with hypertension (2,3).

ROS influence many signaling events, mainly through oxidative modification of proteins. The best established direct molecular targets of ROS are protein tyrosine phosphatases (PTPs), important in modulating tyrosine phosphorylation by counterbalancing effects of protein tyrosine kinases (PTK) (4,5). PTPs are a large, structurally diverse family divided into receptor-like PTPs, cytosolic PTPs and low molecular weight PTPs (LMW-PTP) that are critical regulators of multiple signaling pathways (6,7). All PTPs have a conserved 230 amino acid domain containing a reactive and redox-regulated cysteine, which when oxidized renders the protein inactive (8,9). Inactivation of PTPs by oxidation could be reversible or irreversible. *In vitro* treatment with H_2O_2 induced reversible oxidation of PTP1, LAR (leukocyte antigen-related), and VHR (vaccinia H1-related) PTPs through conversion of the active site cysteine to the reversibly oxidized sulfenic acid form (-SOH) (8). Reversible oxidation also occurs in response to epidermal growth factor (EGF) leading to inhibition of PTP-1B activity in A431 cells (10). Insulin and platelet-derived growth factor (PDGF) stimulation of intact cells is also associated with PTP-

1B and SHP-2 inactivation respectively, through reversible oxidation of the active site cysteine after H_2O_2 stimulation (11,12). Irreversible oxidation of the active site cysteine residue of the PTP-1B to form the sulfonic acid ($-SO_3H$) was demonstrated *in vitro* after treatment with pervanadate (13). Receptor PTPs and LMW-PTPs are also targets for oxidation and redox-mediated inactivation by PDGF, integrins and H_2O_2 (14-17).

Ang II, through ROS, induces transactivation of receptor tyrosine kinases (RTKs) such as EGFR and PDGFR- β . This transactivation allows EGFR to act as a scaffold for other signaling proteins, ultimately leading to activation of growth signaling pathways including MAP kinases and PI3K/AKT in VSMCs (18-20). RTKs interact with numerous PTPs, including SHP-2, to regulate cell function. Activated SHP-2 dephosphorylates substrates that, directly or indirectly, have an inhibitory role in mitogen-activated protein (MAP) kinase and AKT signaling (21).

Here we tested the hypothesis that Ang II induces phosphorylation of growth signaling kinases by oxidation/inactivation of upstream PTPs. We also sought to determine whether Ang II augments tyrosine phosphorylation-dependent signaling in VSMCs from spontaneously hypertensive rats (SHR) versus control Wistar Kyoto rats (WKY) through increased oxidative inactivation of SHP-2. The regulatory role of AT_1R , AT_2R and NAD(P)H oxidase in these processes was investigated.

7.3 METHODS

Cell Culture

The study was approved by the Animal and Human Ethics Committee of the University of Ottawa and carried out according to recommendations of the Canadian Council for Animal Care. VSMCs from mesenteric resistance arteries (important in peripheral resistance and consequently in blood pressure regulation), obtained from 16-week-old WKY and SHR rats (Taconic Farms, Germantown, NY) were isolated by enzymatic digestion and cultured as previously described (22). Cells were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS). Low passaged cells (passages 3–7) rendered quiescent in serum-free medium for 24 hours before experimentation, were used.

Western Blot Analysis

Stimulated quiescent VSMCs were washed with cold PBS and harvested in lysis buffer containing: Na pyrophosphate 50 mmol/L, NaF 50 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na₃VO₄ 2 mmol/L, HEPES pH 7.4, 10 mmol/L, Triton X-100 0.1%, PMSF 50 mmol/L, pepstatin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, aprotinin 1 µg/ml. Plates were placed on dry ice for 5 min and allowed to thaw. Cells were scraped off and disrupted by brief sonication. The protein supernatant was separated by centrifugation and equal amount of proteins were separated by electrophoresis on a SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Boehinger, Mannheim, Laval, Quebec, Canada). Non-specific binding sites were blocked with a 5% w/v non-fat dry milk blocking buffer, containing tris-buffered saline and 0.1% Tween-20 (TBS-T) (1h, room temperature). Membranes

were incubated overnight at 4°C with either anti-phospho-SHP-2 (1:1000), anti-phospho-ERK1/2 (1:1000), anti-phospho-p38MAP kinase (1:1000), anti-phospho-AKT (1:1000) (Cell Signaling) or anti-SHP-2 (1:2500) (BD Biosciences) antibodies. Membranes were then incubated with horse-radish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1h at room temperature and re-incubated with anti- α -actin antibody. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence, exposed to film and blots analyzed densitometrically (Image-Quant software, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

In-gel Phosphatase Assay

The in-gel PTP assay was performed as described by Meng *et al.* (11). Briefly, after stimulation with Ang II (10^{-7} mol/l, 0-60 min) or H₂O₂ (0.1-200 μ M, 10 min), cells were lysed under anaerobic conditions in an argon chamber in order to prevent the spontaneous oxidation of PTPs through the air oxygen. The lysis buffer comprised 25 mM sodium acetate pH 5.5, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 25 μ g/ml aprotinin and 25 μ g/ml leupeptin. Iodoacetic acid (IAA, 10mM), which reacts with the free Cys thiols, can be used to differentiate oxidized PTPs from reduced PTPs in the cell lysate. Lysates (30 μ g) were subjected to an in-gel phosphatase activity assay (23) using SDS-PAGE gels containing [γ -³²P]-labeled poly (4:1) Glu-Tyr substrate (1.5×10^6 cpm/20 ml of gel solution, ~ 2 μ M p-Tyr).

Analysis of oxidized SHP-2 using the oxPTP Antibody

An oxPTP antibody was used to detect reversible oxidation of PTPs derived from cell extracts. The oxPTP antibody was developed to specifically recognize the sulfonic acid form of catalytic site cysteines of PTPs (21,24). VSMCs were stimulated

with Ang II (10^{-7} mol/l, 5 and 10 min) and H_2O_2 (100 μ M, 10 min) and lysed in lysis buffer with or without 30 mM IAA containing 20 mM Tris pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM benzamidine, 1% aprotinin. Lysis was performed at room temperature in the dark for 20 min. Before use, the lysis buffer was degassed for 20 min to avoid oxidation of PTPs during the lysis step. SHP-2 PTP was collected by immunoprecipitation using anti-SHP-2 antibody. Protein G Plus-Agarose beads (Calbiochem) were washed three times in lysis buffer, reduced with 5 mM DTT for 10 min on ice and washed three times in 20 mM Hepes (pH 7.5) before incubation with 100 μ M pervanadate for 1 h at 4°C. After adding Laemmli sample buffer to the beads, the samples were boiled for 5 min and run on a SDS-polyacrylamide gel. Samples were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for 1h at 100V. For detection, blots were blocked in 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Tween in 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl for 1 hour and incubated with the anti-oxPTP (1:1000) antibody (overnight at 4 °C). Membranes were then incubated with secondary horseradish-peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (1:5000, BD Pharmigen) for 1h at room temperature. The antibody signals were visualized by chemi-luminescence. Membranes were stripped and re-probed with SHP-2 antibody and subsequently developed using chemi-luminescence.

RNA Interference and Cell Transfection

High-performance purity grade (>90% pure) small interfering RNAs (siRNA) were generated against rat SHP-2 (QIAGEN Inc). The DNA target sequences of the annealed double stand siRNA that we used were as follows: 5'-AAG AGT TAC ATT GCC ACT CAA-3' (1074–1094), which has 100% homology to SHP-2 rat gene only. Cells were exposed to transfectant alone (control cells) or transfected with siRNA as

described earlier (25). A non-silencing siRNA oligonucleotide sequence (NS siRNA) that does not recognize any known homology to mammalian genes was also generated as a negative control. Cells were seeded at a density of 2.5×10^5 cells/well in 60 mm plates and grown in DMEM containing 10% FBS. Cells were transfected with siRNA using HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen Inc) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 37.5 ng siRNA was diluted in 100 μ l culture medium without serum to give a final concentration of 5 nM. HiPerFect transfection reagent was added to the diluted siRNA and the mix was incubated for 10 min to allow the formation of transfection complexes. The lipid-formulation was added drop wise onto the cells. 24, 48 and 72 hours after transfection, gene silencing was monitored at the protein levels by Western blotting as described above. Control cells were exposed to the transfectant in the absence of siRNA.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Groups were compared using one-way ANOVA or Student *t* test as appropriate. Newman-Keuls Post-test was used to compensate for multiple testing procedures. A value of $P < 0.05$ was significant.

7.4 RESULTS

Ang II and H₂O₂ induce reversible oxidation of multiple PTPs

The reversible oxidation of various PTPs after Ang II stimulation in WKY and SHR cells was assessed by the in-gel PTP activity assay. Only the activity of those PTPs susceptible to ROS- induced oxidation are recovered and visualized by the appearance of a clear, white area of dephosphorylation, surrounding the position of the PTP in the gel on the black background of radioactivity labeled substrate. Here, we show that stimulation of cells with Ang II (10^{-7} mol/l, 0-30 min) resulted in a rapid oxidation and inhibition of at least 3 visible PTPs. Whereas in SHR cells oxidation of the arbitrarily named PTPs, PTP1 and PTP3 was increased after 5 min and 15 min of Ang II stimulation ($p < 0.05$), respectively, oxidation of PTPs in WKY cells was reduced or unchanged (Fig. 1A). H₂O₂- induced (0.1-200 μ M, 10 min) oxidation of PTPs in VSMCs was used as a positive control (Fig. 1B). These results demonstrate the potential for Ang II- mediated ROS generation to induce oxidation and inactivation of PTPs in SHR cells which may explain, in part, increased tyrosine phosphorylation-dependent signaling in SHR versus WKY VSMCs.

Expression and phosphorylation of SHP-2 in WKY and SHR VSMCs

Of the many PTPs observed, we investigated in greater detail whether one of the Ang II-regulated PTPs in VSMCs may be SHP-2. SHP-2 has been implicated in many signaling pathways in VSMCs (20,21). Higher basal expression ($p < 0.01$) and phosphorylation ($p < 0.05$) of SHP-2 was observed in WKY cells compared to SHR cells (Fig. 2A). Ang II increased SHP-2 phosphorylation in both WKY ($p < 0.001$) and SHR ($p < 0.05$) cells. However, the magnitude of Ang II-induced SHP-2 phosphorylation was lower in SHR cells compared with WKY (Fig. 2B).

Ang II regulation of SHP-2 is mediated through the AT₁R and via NAD(P)H oxidase-derived ROS.

To evaluate possible mechanisms whereby Ang II regulates SHP-2, VSMCs from WKY rats were exposed to the AT₁R blocker Valsartan, the AT₂R blocker PD123319 and to the NAD(P)H oxidase inhibitor Apocynin, prior to Ang II stimulation. Ang II-induced phosphorylation of SHP-2 was significantly diminished by pre-incubation of cells with Valsartan ($p < 0.05$) (Fig. 3A) and Apocynin ($p < 0.05$) (Fig. 3C). PD123319 did not influence Ang II-induced SHP-2 phosphorylation (Fig. 3B). These results suggest that Ang II-dependent regulation of SHP-2 is mediated through the AT₁R and via NAD(P)H oxidase-generated ROS. Neither Valsartan, PD123319 nor Apocynin influenced basal SHP-2 status.

Detection of SHP-2 PTP oxidation by Ang II using an oxPTP antibody

Using a novel antibody-based method described by Persson C. *et al* (24), we assessed the oxidation of SHP-2 by Ang II and H₂O₂ stimulation in VSMCs. This procedure involves alkylation of reduced PTPs with IAA, pervanadate-induced oxidation to sulfonic acid forms of reversibly oxidized PTPs and detection of oxidized SHP-2 by immunoprecipitation with oxPTP antibody. To increase the efficiency of pervanadate oxidation of reversibly oxidized PTPs, samples were reduced by incubation with DTT. As shown in Fig. 4, SHP-2 oxidation was clearly detected after Ang II (5 and 10 min) stimulation. Oxidation of SHP-2 in control conditions was almost undetectable. H₂O₂-stimulated (100 μ M, 10 min) cells were used as a positive control.

Knockdown of SHP-2 expression in VSMCs increases Ang II-induced activation of AKT but not of ERK1/2 and p38MAP kinase

We used double strand RNAs to knock down the expression of rat SHP-2 in VSMCs (QIAGEN Inc). To evaluate whether siRNA downregulated SHP-2 expression in VSMCs western blotting analysis was performed using anti-SHP-2 antibody. α -actin was used as an internal control. As shown in figure 5, maximal SHP-2 siRNA suppression was observed after 24h of incubation with siRNAs. The expression of SHP-2 was significantly reduced in WKY and in SHR VSMCs ($p < 0.001$). Since the knock down of SHP-2 was efficient after 24h of incubation, we used this time point for further experiments.

The functional significance of SHP-2 oxidation/inactivation was evaluated by assessing signaling growth responses to Ang II in SHP-2 knockdown cells. We treated cells with Ang II and analyzed the activation of downstream signaling pathways after downregulating SHP-2 with SHP-2 siRNA (Fig. 6). Short-term (5 minutes) VSMC exposure to Ang II (10^{-7} mol/l) induced an increase ($p < 0.05$) in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 6A), p38MAP kinase phosphorylation (Fig. 6B) and AKT phosphorylation (Fig. 6C). siRNA downregulation of SHP-2 was associated with a significant increase in Ang II- induced phosphorylation of AKT in both WKY and SHR cells but did not affect ERK1/2 and p38 phosphorylation. These results suggest that SHP-2 specifically regulates Ang II activation of AKT pathways in VSMCs. ERK1/2, p38MAP kinase and AKT phosphorylation were similar in control, siRNA-transfected and NS siRNA transfected cells. Protein levels of α -actin were unaffected by siRNA transfection.

7.5 DISCUSSION

Major findings from the present study demonstrate that 1) Ang II induces reversible oxidation and inactivation of multiple PTPs, including SHP-2, 2) Ang II effects are mediated via the AT₁R and involve NAD(P)H oxidase-generated ROS, 3) SHP-2 phosphorylation is blunted and oxidation/inactivation is enhanced in VSMCs from SHR, and 4) SHP-2 negatively regulates AKT, but not ERK1/2 or p38MAPK, signaling in VSMCs. These novel data indicate that Ang II inactivates vascular PTPs through oxidative processes, which are dysregulated in SHR. Increased PTP oxidation/inactivation, possibly due to enhanced NAD(P)H oxidase-mediated ROS generation as we previously demonstrated (2,3), may contribute to increased activation of some growth signaling pathways in VSMCs from SHR. We also identify, for the first time, that SHP-2 is a direct ROS target and that it is an important upstream regulator of AKT in Ang II-stimulated VSMCs.

Ang II is now recognized as a multifunctional hormone influencing many cellular processes involved in the regulation of vascular function, including proliferation, migration and inflammation (26). The pleiotropic vascular effects are mediated in large part through NAD(P)H oxidase-driven generation of ROS, which function as important intracellular and intercellular second messengers to modulate downstream signaling molecules, such as PTPs (6,7). PTPs are a large, structurally diverse family of which SHP-2 appears to be important in cardiovascular cells (27,28). SHP-2 is a 68 kD non-transmembrane-type PTP, also known as PTP1D, PTP2C, Syp and SH-PTP2 (27,28).

PTPs are regulated through multiple mechanisms (29,30), of which oxidation of active site cysteine residues appears to be critical (8,10,11). Because of their

particular structure, PTPs are susceptible to oxidation and consequent inactivation by ROS (31). PTP-1B has been shown to be directly inactivated by ROS on its catalytic Cys215 in A431 cells stimulated with EGF (32). Using the in gel PTP assay we demonstrate that Ang II induces reversible inactivation of multiples PTPs in WKY and SHR VSMCs, which we arbitrarily termed PTP-1, PTP-2 and PTP-3. Whereas this induction was blunted in WKY cells, it was increased in SHR cells. In support of our findings, others have shown that activation of PDGFR, EGFR, insulin receptor and FGFR produce H_2O_2 , which reduces PTP activity (33,34). Lee and colleagues (34) demonstrated that EGF-induced PTP1B inactivation is dependent on reversible oxidation of cysteine residues by H_2O_2 . This is particularly important with respect to Ang II, which mediates many of its signaling events in vascular cells through EGFR transactivation (2). Beside H_2O_2 , other ROS may inactivate PTPs by oxidation. Recent studies suggest that PTP1B may be more efficiently regulated by O_2^- than by H_2O_2 (38). Peroxynitrite rapidly and irreversibly inhibits PTPs, supporting the role of this ROS in oxidative damage.

To further evaluate how Ang II regulates PTPs, in addition to the in gel PTP assay, we used an antibody-based method to identify a putative PTP that is specifically oxidized/inactivated by Ang II stimulation in VSMCs. Using this approach, we demonstrate for the first time that Ang II-derived ROS production inactivates, by oxidation, SHP-2 PTP (Fig. 4). Meng TC *et al.* (11) previously reported that SHP-2 is reversibly oxidized by PDGF-BB stimulation in RAT-1 cells.

We also show that in the basal state, SHP-2 is expressed in VSMCs and is differentially regulated in VSMCs from SHR compared with WKY cells. The expression and phosphorylation of the enzyme is downregulated in SHR VSMCs. Ang

II regulates SHP-2 by increasing its phosphorylation in both WKY and SHR cells with a blunted effect in SHR cells. To evaluate mechanisms whereby Ang-II influences SHP-2, VSMCs were exposed to the AT₁R blocker, Valsartan, the AT₂R blocker, PD123319 and to the NAD(P)H oxidase inhibitor, Apocynin prior to Ang II stimulation. Using these pharmacological tools we show that Ang II-mediated phosphorylation of SHP-2 involves the AT₁R as previously reported (35) and activation of NAD(P)H oxidase. Dysregulation of the basal expression and phosphorylation of SHP-2 as well as Ang II-induced SHP-2 phosphorylation in SHR may contribute to altered vascular signaling in hypertension (26).

Since several studies reported that growth factor RTKs are recognized as substrates by various PTPs (36) and that SHP-2 transduces mitogenic and pro-migratory signals from various types of receptors (37,38), we evaluated the functional significance of SHP-2 oxidation by Ang II production of ROS in VSMCs. We generated siRNAs to selectively reduce SHP-2 expression using a lipid based system for siRNA transfection. We demonstrate that SHP-2 downregulation significantly increases Ang II- induced phosphorylation of AKT in both WKY and SHR cells but did not affect ERK1/2 and p38MAP kinase activity. These findings suggest that SHP-2 specifically regulates Ang II activation of the AKT pathway in VSMCs. Other PTPs, such as PTPB1 and MAPK phosphatase, probably regulate MAP kinases. Although signals transmitted through SHP-2 in response to Ang II are not well characterized, it seems that SHP-2 associates with substrates involved in the AKT pathway. AKT, also known as protein kinase B, regulates essential cellular functions such as migration, proliferation, differentiation and apoptosis (39). Furthermore, AKT is a critical regulator of PI3K-mediated cell survival (41-44). Numerous studies demonstrated that

consecutive activation of AKT signaling is sufficient to block cell death induced by a variety of apoptotic stimuli and that transduction of dominant negative AKT inhibits growth factor-induced cell survival (42). Furthermore, AKT regulates cell cycle and cellular senescence, at least in part, through modulating activities of cell cycle proteins such as E2F, p21, MDM2 and human telomerase reverse transcriptase subunit (hTERT) (43-45). Also, AKT enhances protein synthesis through increasing the phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and S6 kinase (46). With respect to the role of AKT in vascular homeostasis and angiogenesis, results obtained in our study are important since Ang II, through its G-protein coupled receptor, exhibits cross-talk with RTK-mediated PI3-K/AKT activation in human coronary VSMCs (47). Also, SHP-2 associates with the IRS-1 in response to insulin (48). Furthermore, it has been reported that SHP-2 function includes dephosphorylation of the IGF-1 receptor (49). Thus, activation of vascular AKT by Ang II may be mediated, in part, through redox-dependent inactivation of SHP-2 PTP.

In summary, this study demonstrates that Ang II stimulation induces oxidation and inactivation of multiple PTPs in VSMCs, among which SHP-2 PTP is important. SHP-2 expression and phosphorylation are differentially regulated in SHR cells. The functional significance of SHP-2 oxidation/inactivation includes increased AKT signaling by Ang II. Our findings highlight the importance of PTPs as direct redox-sensitive molecular targets in Ang II-stimulated VSMCs. Altered PTP regulation by increased oxidative stress may contribute to increased PTP inactivation and associated upregulation of vascular signaling cascades in SHR.

7.6 ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Nicholas K. Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) is gratefully acknowledged for providing us with the plasmid encoding the GST-FER fusion protein. We are grateful to Dr Timothy L. Reudelhuber (Clinical Research Institute of Montreal, QC, Canada) for technical help. This study was funded by grant 44018 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Fatiha Tabet received a Canada Graduate Scholarship Doctoral Award from the CIHR.

7.7 REFERENCES

- 1- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
- 2- Tabet F, Schiffrin EL, Touyz RM. Mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide is mediated through tyrosine kinase-dependent, protein kinase C-independent pathways in vascular smooth muscle cells: upregulation in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2005;23(11):2005–2012.
- 3- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):339-52.
- 4- Stoker AW. Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol.* 2005;185(1):19-33.
- 5- Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 1995;80(2):225-36.
- 6- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 2004;117(6):699-711.
- 7- Anderson JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, Jansen PG, Andersen HS, Tonks NK & Moller NP. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Molecular and Cellular Biology.* 2001;21:7117-7136.
- 8- Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry.* 1998;37(16):5633-42.

- 9- Xu D, Rovira II, Finkel T. Oxidants painting the cysteine chapel: redox regulation of PTPs. *Dev Cell*. 2002;2(3):251-2.
- 10- Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15366-72.
- 11- Meng TC, Fukada T, Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*. 2002;9(2):387-99.
- 12- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21938-42.
- 13- Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem*. 1997;272(2):843-51.
- 14- Blanchetot C, Tertoolen LGJ, Hertog JD. Regulation of receptor protein tyrosine phosphatase α by oxidative stress. *EMBO J*. 2002; 21: 493–503.
- 15- Persson, C., Sjöblom, T., Groen, A., Kappert, K., Engström, U., Hellman, U., Heldin, C. H., den Hertog, J., and Östman, A. Preferential oxidation of the second phosphatase domain of receptor-like PTP- α revealed by an antibody against oxidized protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:1886–1891.
- 16- Chiarugi P, Fiaschi T, Taddei ML, Talini D, Giannoni E, Raugei G, Ramponi G. Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33478-87.

- 17- Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, Symons M, Borrello S, Galeotti T, Ramponi G. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol.* 2003;161(5):933-44.
- 18- Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(1):3-7.
- 19- Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(2):159-67.
- 20- Vantler M, Caglayan E, Zimmermann WH, Baumer AT, Rosenkranz S. Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle cells. Only phosphatidylinositol 3'-kinase is important. *J Biol Chem.* 2005;280(14):14168-76.
- 21- Kappert K, Peters KG, Bohmer FD, Ostman A. Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling. *Cardiovasc Res.* 2005;65(3):587-98.
- 22- Touyz RM and Yao G. Modulation of vascular smooth muscle cell growth by magnesium-role of mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol.* 2003;97: 326-335.
- 23- Burrige K, Nelson A. An in-gel assay for protein tyrosine phosphatase activity: detection of widespread distribution in cells and tissues. *Anal Biochem.* 1995;232(1):56-64.

- 24- Persson C, Kappert K, Engstrom U, Ostman A, Sjoblom T. An antibody-based method for monitoring in vivo oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Methods*. 2005;35(1):37-43.
- 25- He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circ Res*. 2005;96(2):207-15.
- 26- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):639-72.
- 27- Freeman RM Jr, Plutzky J, Neel BG. Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of *Drosophila* corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(23):11239-43.
- 28- Byon JC, Kenner KA, Kusari AB, Kusari J. Regulation of growth factor-induced signaling by protein-tyrosine-phosphatases. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;216(1):1-20.
- 29- Uchida T, Matozaki T, Noguchi T, Yamao T, Horita K, Suzuki T, Fujioka Y, Sakamoto C, Kasuga M. Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem*. 1994;269(16):12220-8.
- 30- Liu F, Chernoff J. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor. *Biochem J*. 1997;327(Pt 1):139-45.
- 31- Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*. 2005;121(5):667-70.

- 32- Barrett WC, DeGnore JP, Konig S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry*. 1999;38(20):6699-705.
- 33- Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE*. 2000;2000(53):PE1.
- 34- Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15366-72.
- 35- Doan T, Farmer P, Cooney T, Ali MS. Selective down-regulation of angiotensin II receptor type 1A signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2004;16(3):301-11.
- 36- Ostman A, Bohmer FD. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol*. 2001;11(6):258-66.
- 37- Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(6):284-93.
- 38- Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res*. 1999;253(1):47-54.
- 39- Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle*. 2006;5(5):512-8.
- 40- Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 1995;267(5206):2003-6.

- 41- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 1995;81(5):727-36.
- 42- Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation*. 2000;101(6):660-7.
- 43- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13085-90.
- 44- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*. 2001;3(3):245-52.
- 45- Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11598-603.
- 46- Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(4):E715-29.
- 47- Hafizi S, Wang X, Chester AH, Yacoub MH, Proud CG. ANG II activates effectors of mTOR via PI3-K signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(3):H1232-8.
- 48- Kuhne MR, Pawson T, Lienhard GE, Feng GS. The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem*. 1993;268(16):11479-81.

49- Maile LA, Clemmons DR. Regulation of insulin-like growth factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and the tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem.* 2002;277(11):8955-60.

7.8 LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Ang II (A) and H₂O₂ (B) induce rapid oxidation of multiple PTP in VSMCs. Lysates were prepared under anaerobic conditions in the presence of 10 mM IAA and then subjected to the in-gel PTP assay. (A) Top panels represent the in-gel PTP activity assay visualized by autoradiography. Arrowheads indicate the PTPs, arbitrarily termed PTP1, PTP2 and PTP3, that were oxidized in response to Ang II (10⁻⁷ mol/l, 0-30 min) stimulation. Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. (B) Representation of the in-gel PTP activity assay in the presence or absence of 10 mM IAA, in response to H₂O₂ (0.1-200 μM, 10 min) stimulation. Data are presented as means ± SEM of 3 to 4 experiments. *p<0.05 vs. control.

Figure 2. SHP-2 protein expression and phosphorylation in VSMCs from WKY and SHR rats. Basal SHP-2 expression and phosphorylation (A) and Ang II-induced phosphorylation of SHP-2 were examined by immunoblotting. Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of 5 to 6 experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Control or WKY.

Figure 3. Phosphorylation of SHP-2 by Ang II is mediated through the AT₁R and NAD(P)H oxidase in WKY VSMCs. Cells were pretreated with Valsartan (10⁻⁵mol/l, 30 min), PD123319 (10⁻⁵mol/l, 30 min) or Apocynin (10⁻⁵mol/l, 3 hours) before Ang II (10⁻⁷ mol/l, 5 min) addition. Left panels are representative immunoblots of SHP-2 phosphorylation by Ang II. Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of 3 to 4 experiments. *p<0.05 vs. Ang II, **p<0.01 vs. Ctl.

Figure 4. Ang II-induced oxidation of SHP-2 in VSMCs. VSMCs were stimulated with Ang II (10^{-7} mol/l, 5 and 10 min) or H_2O_2 (100 μ M, 10 min) and lysed with or without IAA as indicated. SHP-2 was immunoprecipitated from cell lysate and subjected to pervanadate treatment. Immunoprecipitated SHP-2 was analyzed by consecutive immunoblotting with oxPTP and SHP-2 antibodies.

Figure 5. SHP-2 siRNA downregulates SHP-2 expression in both WKY VSMCs (A) and SHR VSMCs (B). Protein abundance was assessed by western blotting. VSMCs were transfected with SHP-2 siRNA (24, 48 and 72 hours) or non-silencing (NS siRNA), used as a negative control. Control cells were exposed to transfectant without siRNA. Data are expressed as the SHP-2: α -actin ratio and represented as mean \pm SEM of 3 experiments. * p <0.01 and ** p <0.001 vs. control.

Figure 6. Effects of SHP-2 knockdown on Ang II-induced activation of ERK1/2 (A), p38MAP kinase (B) and AKT (C). VSMCs were transfected with SHP-2 siRNA or non-silencing (NS siRNA) for 24 h and cell extracts were analyzed by western blotting with phospho-specific anti-ERK1/2, anti-p38MAP kinase and anti-AKT antibodies. Data are expressed as the SHP-2: α -actin ratio and represented as the mean \pm SEM of 3 experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. control and # p <0.001 vs. Ang II.

Figure 1

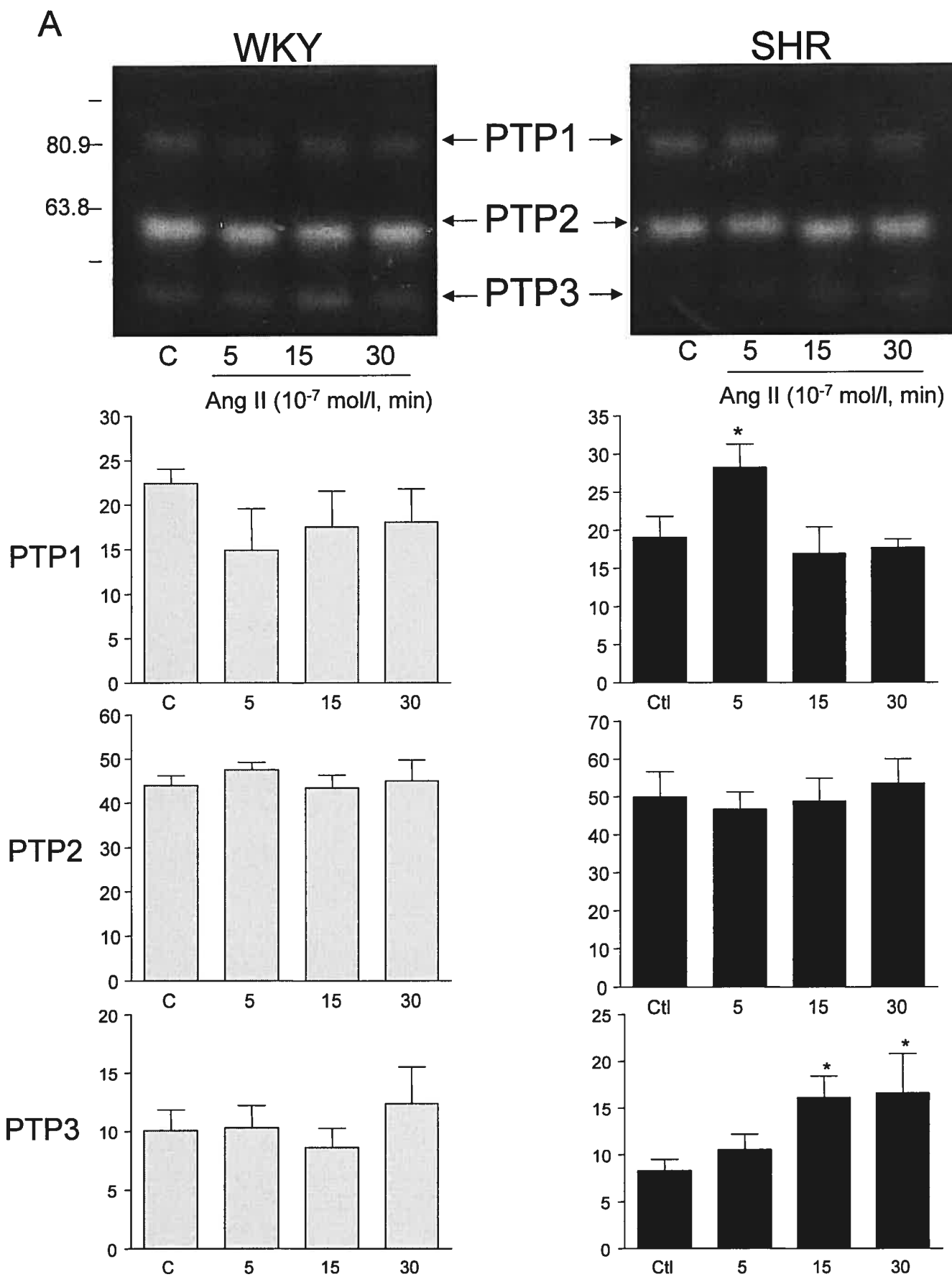


Figure 1

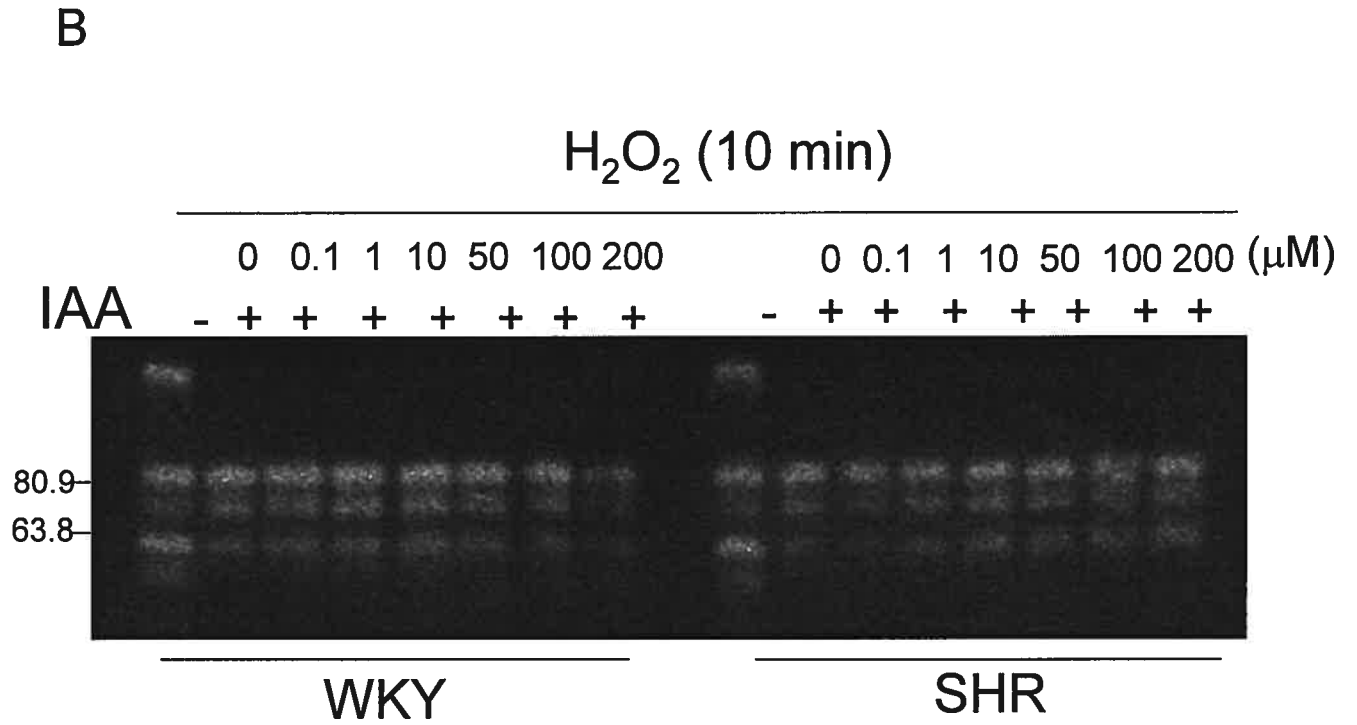


Figure 2

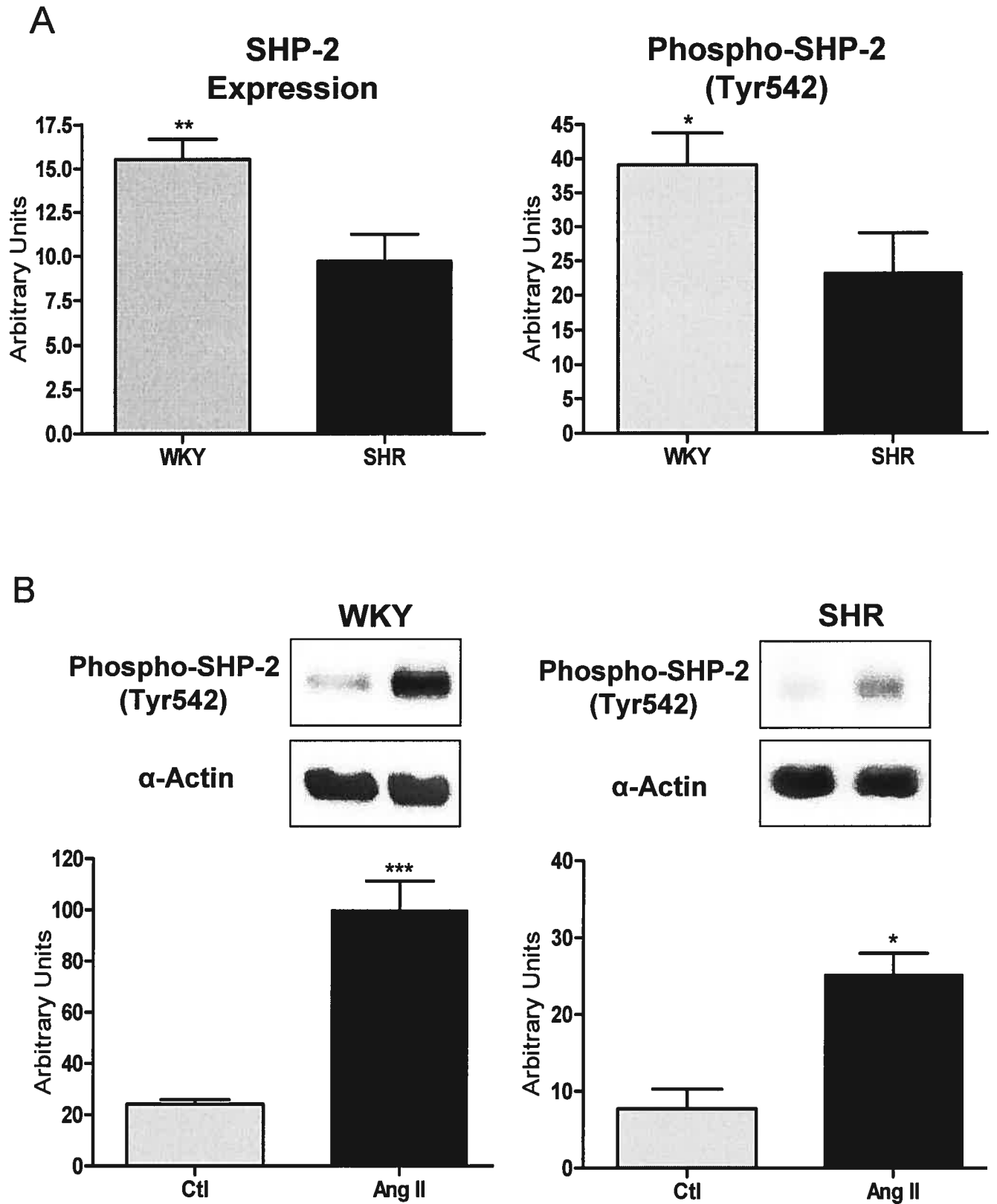


Figure 3

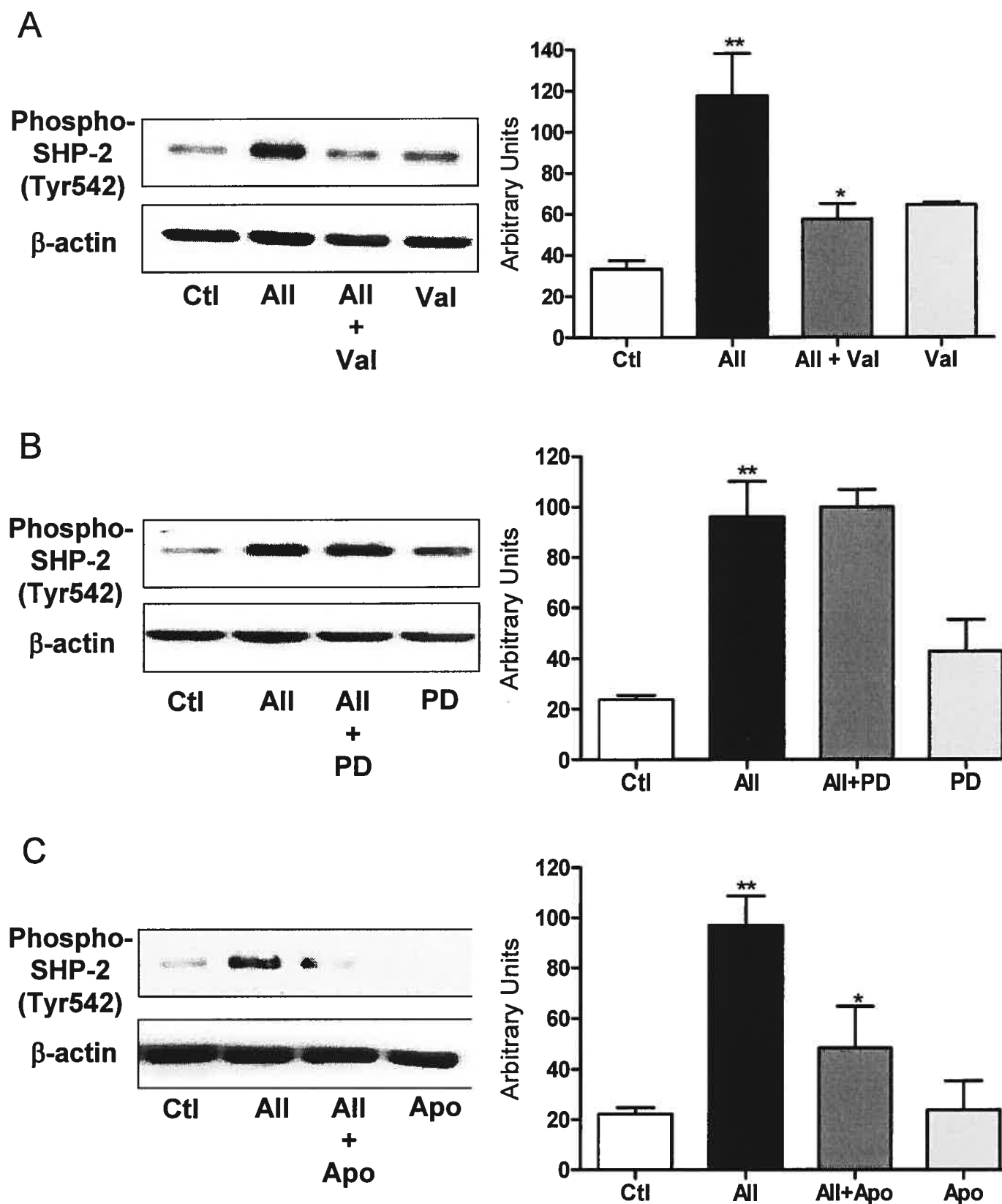


Figure 4

IP: anti-SHP-2
Blot: anti-OxPTP



IP: anti-SHP-2
Blot: anti-SHP-2



-IAA Control Ang II (5 min) Ang II (10 min) H₂O₂ (10 min)

+ IAA

Figure 5

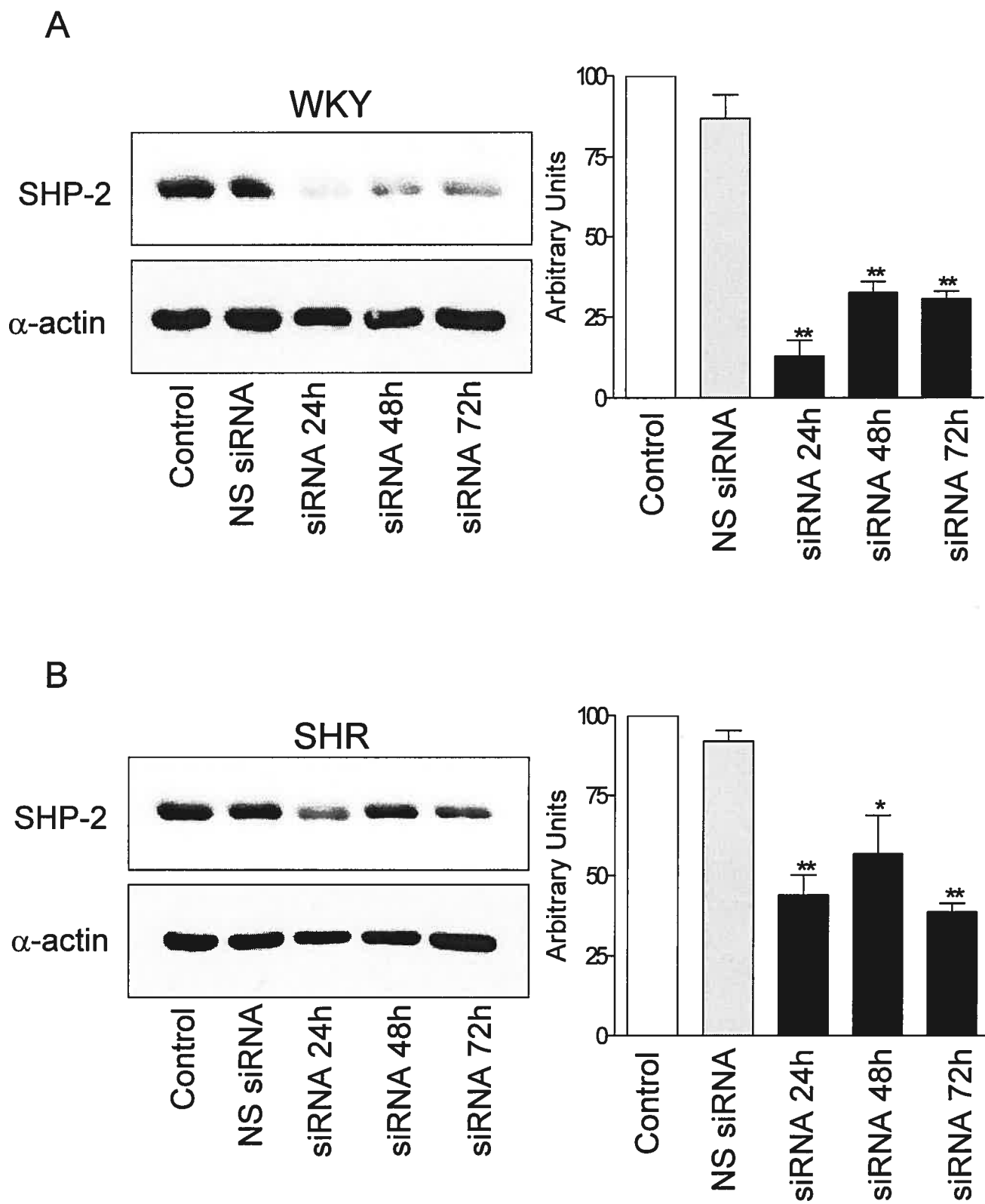


Figure 6

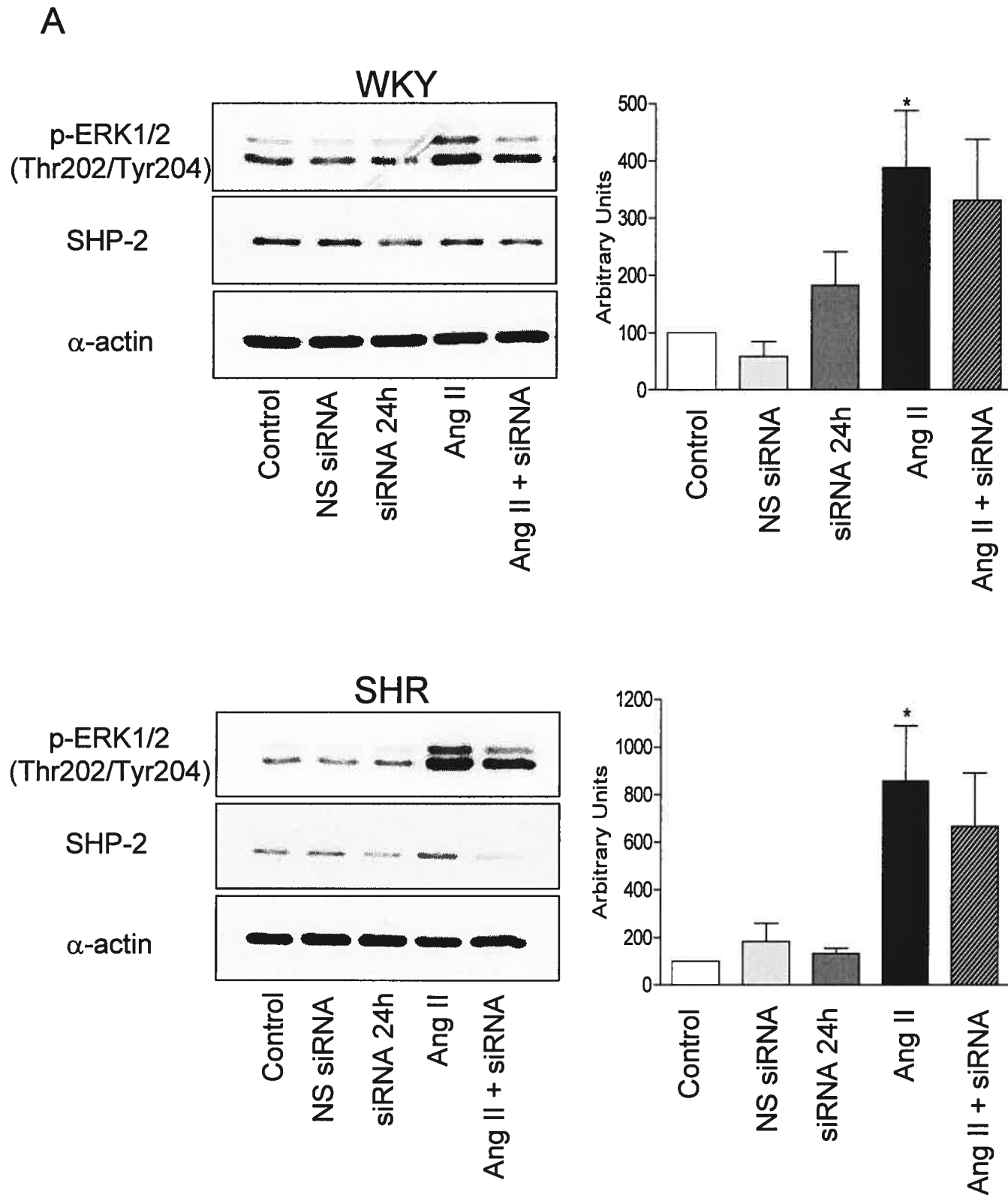


Figure 6

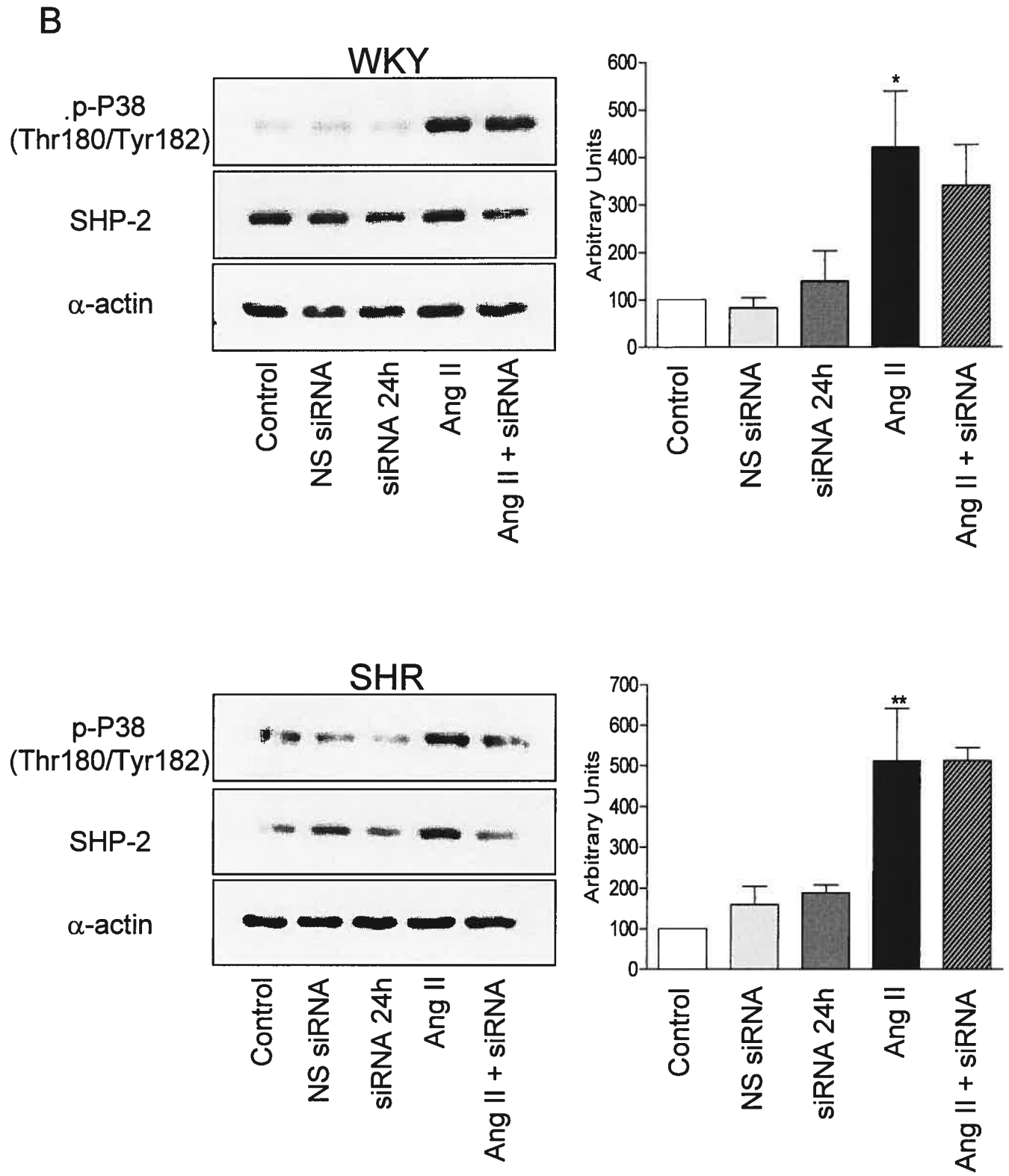
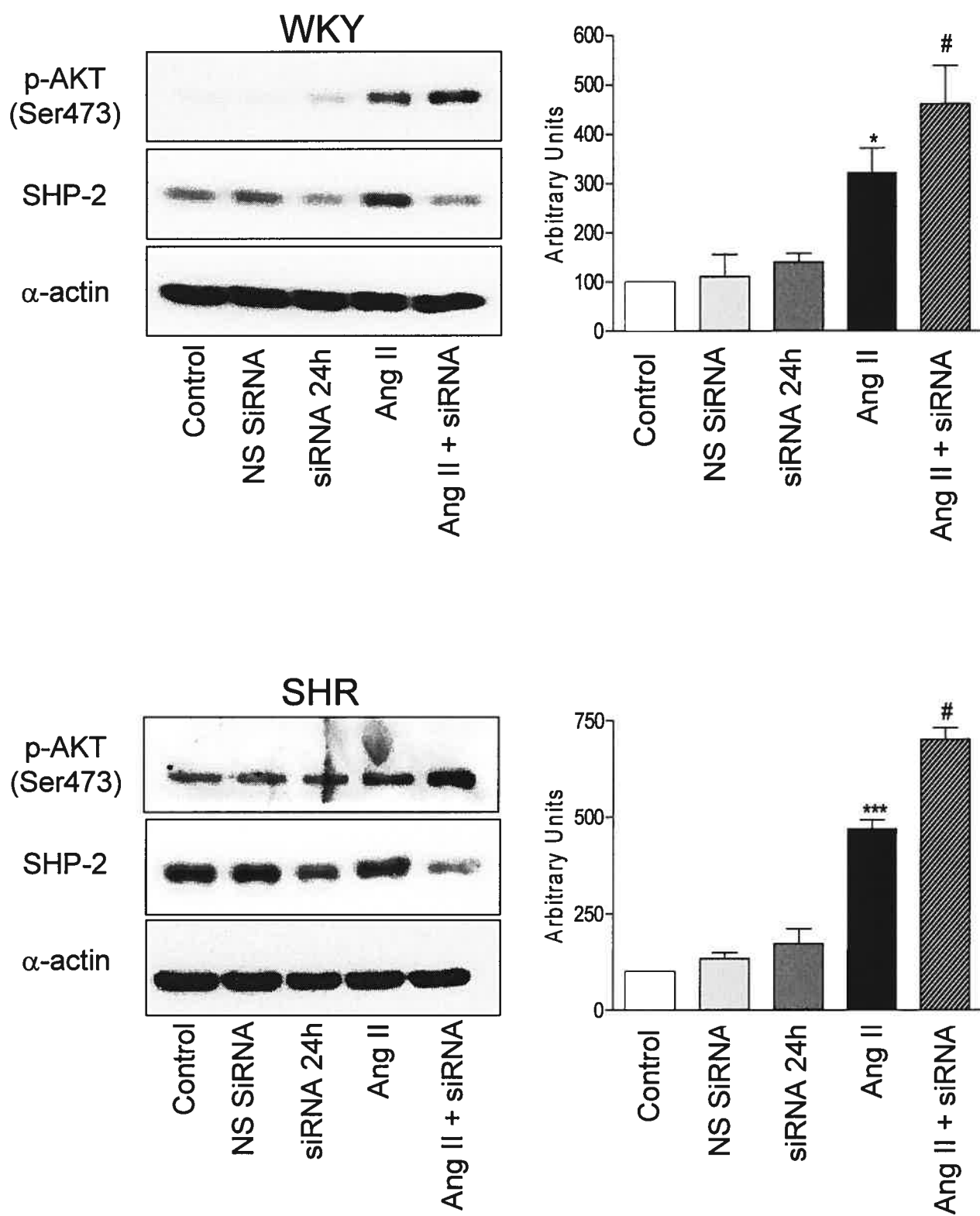


Figure 6

C



TROISIÈME PARTIE

**DISCUSSION, CONCLUSION,
BIBLIOLGRAPHIE ET ANNEXE**

DISCUSSION

Dans notre première étude, nous avons étudié les rôles spécifiques que jouent les DROs, $\bullet\text{O}_2^-$ et le H_2O_2 , dans la régulation du tonus vasculaire en hypertension artérielle. Nous démontrons que : 1- Les DROs augmentent à la fois la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLVs et la contraction des petites artères de résistance des rats SHR comparativement aux rats WKY. Ces effets dépendent principalement de l'influx de Ca^{2+} extracellulaire via les canaux calciques de type L; canaux qui semblent être sur-régulés chez le SHR. 2- Dans les CMLVs de rats SHR comparativement aux rats WKY, le H_2O_2 et le $\bullet\text{O}_2^-$ régulent de manière différente les $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Tandis que le H_2O_2 induit une augmentation des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et une augmentation de la contraction des artères de résistance mésentériques des rats SHR lorsque comparés aux rats WKY, les effets de l' $\bullet\text{O}_2^-$ sont diminués chez les SHR.

La deuxième étude reflète de l'importance du H_2O_2 dans l'activation des MAP kinases ERK1/2 et p38MAP kinase, protéines de la signalisation intracellulaire qui jouent un rôle important dans la prolifération, différenciation et migration des CMLVs. Nous démontrons que l'activation des MAP kinases est significativement plus élevée chez les SHR comparativement aux WKY. Les mécanismes menant à l'activation des MAP kinases (ERK1/2 et p38 MAP kinase) par le H_2O_2 sont dépendants des tyrosines kinases mais ne semblent pas impliquer la PKC. De plus, nous démontrons que les patrons de signalisation menant à l'activation de ERK1/2 et p38MAP kinase par le H_2O_2 sont différents. En effet, tandis que les protéines tyrosines kinases de type récepteur et non récepteur sont impliquées dans l'activation

d'ERK1/2, uniquement les protéines tyrosines kinases de type non récepteur sont impliquées dans l'activation de p38 MAP kinase par le H₂O₂.

Dans notre dernière étude, nous démontrons, pour la première fois, que 1- l'Ang II, à travers la production des DROs, induit l'inactivation/oxydation de certaines PTPs vasculaires incluant SHP-2. Nous démontrons également que l'inactivation par oxydation des PTPs est un phénomène qui est dérégulé en hypertension artérielle (SHR). 2- SHP-2 PTP constitue une cible directe de l'action des DROs dans les CMLVs. 3- La phosphorylation de SHP-2 par l'Ang II est régulée à la baisse chez les SHR comparativement aux WKY; et implique le récepteur AT-1 et la NAD(P)H oxydase. 4- SHP-2 est impliquée dans l'activation de AKT mais pas de ERK1/2 et p38 MAP kinase par l'Ang II, suggérant l'importance de cette phosphatase dans l'activation de certaines voies de signalisation menant à la croissance et la survie des CMLVs.

Les DROs incluent le $\bullet\text{O}_2^-$, le H_2O_2 , le OH^- et les dérivés nitrogènes de l'oxygène (NO et ONOO^-). Dans des conditions physiologiques normales, la production des DROs au niveau de la paroi vasculaire est étroitement contrôlée et régulée. Dans les situations pathophysiologiques, telle que l'hypertension artérielle, la production des DROs au niveau de toutes les couches (intima, média et adventice) de la paroi vasculaire est augmentée. De ce fait, les DROs contribuent de manière significative aux dommages vasculaires tels que la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire associés à l'hypertension artérielle.

Dans l'hypertension essentielle humaine, plusieurs études cliniques ont démontré que l'utilisation d'antioxydants tels que la vitamine C et la glutathionne entraîne la réduction significative de la pression artérielle (Ceriello A *et al.* 1991). La diminution de la pression artérielle est associée à une amélioration de la fonction artérielle. Ainsi, il a été prouvé que la vitamine C, par exemple, améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium et ceci suite à l'augmentation de l'activité de la NOS (Taddei S *et al.* 1998). De plus, la combinaison de plusieurs antioxydants pourrait avoir des effets additifs ou synergiques sur la neutralisation des DROs, l'augmentation de la production de NO , l'amélioration de la vasodilatation endothéliale et la diminution de la pression artérielle (Galley HF *et al.* 1997). Dans les expériences décrites dans le chapitre 5, nous avons étudié les rôles spécifiques que jouent le $\bullet\text{O}_2^-$ et le H_2O_2 dans la régulation du tonus vasculaire en hypertension artérielle. Même si tous les DROs sont dérivés de la réduction des molécules d'oxygènes, les différentes propriétés chimiques des différents DROs ont des implications importantes et distinctes dans la signalisation intracellulaire des CMLVs.

C'est la raison pour laquelle, nous avons comparé les effets du $\bullet\text{O}_2^-$ et du H_2O_2 sur la signalisation calcique des CMLVs. De plus, nous avons évalué si ces effets sont altérés en hypertension artérielle en utilisant le modèle spontanément hypertendu SHR. La raison pour laquelle nous avons utilisé ce modèle animal d'hypertension artérielle vient du fait que le rats SHR développe l'hypertension artérielle de manière spontanée; et les causes exactes expliquant la hausse de la pression artérielle avec l'âge ne sont pas connues. De ce fait, le modèle SHR mime l'hypertension artérielle primaire/essentielle chez l'humain. De plus, il y a une composante génétique associée au développement de l'hypertension dans ce modèle. Plusieurs gènes sont impliqués dans le développement de l'hypertension chez le SHR et il a été clairement établi qu'il y avait une augmentation de la résistance vasculaire périphérique ainsi qu'une augmentation de l'activité du SNS dans ce modèle (Yamori Y, 1999). Dans nos études, nous avons utilisé des rats SHR âgés de 16 semaines. À cet âge, la pression artérielle systolique peut atteindre 200mmHg. De ce fait, l'augmentation de la pression artérielle et l'augmentation du tonus neurogénique sont associés à une augmentation de la synthèse protéique et à un changement de la structure des vaisseaux sanguin permettant ainsi le maintien d'une pression artérielle élevée dans ce modèle (Yamori Y, 1994).

Très peu d'études comparant les effets des DROs sur l'homéostasie du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLVs provenant des rats hypertendus SHR comparativement à celles des rats normotendus WKY ont été effectuées. Les résultats de notre étude démontent qu'à la fois le H_2O_2 et l' $\bullet\text{O}_2^-$ entraînaient une augmentation significative de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ au niveau des CMLVs. L'augmentation, induite par avec le H_2O_2 , de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ était plus élevée dans les CMLVs des rats SHR comparativement aux CMLVs des rats WKY.

Les effets de l' $\bullet\text{O}_2^-$ sur les $[\text{Ca}^{2+}]_i$ étaient diminués chez dans les CMLVs des rat SHR. Ces résultats démontrent que différentes espèces de DROs activent différents signaux de transduction entraînant ainsi des effets divergents sur la signalisation calcique. Le $\bullet\text{O}_2^-$ est une molécule excessivement instable qui possède une très courte durée de vie. Elle est soluble dans l'eau et agit comme un agent oxydant, où elle est réduite en H_2O_2 , ou encore comme un agent réducteur, donnant son électron pour former le ONOO^- . Le H_2O_2 est principalement produit par la dismutation de l' $\bullet\text{O}_2^-$, cette réaction peut être spontanée ou encore catalysée par la SOD. Le H_2O_2 possède une durée de vie plus longue que celle de l' $\bullet\text{O}_2^-$ et à la capacité de traverser les membranes cellulaires. Le H_2O_2 est éliminé par la catalase ou la GPX mais peut également être réduit pour former le OH^- qui est une molécule extrêmement réactive. De ce fait, le H_2O_2 a la possibilité de se déplacer loin de l'endroit où il a été formé pour induire des dommages à ce niveau (Fridovich I, 1997). De manière similaire à notre étude, il a été démontré que l' $\bullet\text{O}_2^-$ et le H_2O_2 augmentent les $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLVs et dans les ECs, mais contrairement à notre étude ou cette augmentation est principalement due à un l'influx du calcium des canaux calciques, d'autres études démontrent que cette augmentation par les DROs peut être une conséquence de la mobilisation du calcium InsP_3 -dépendante et de la diminution de l'activation de la Ca^{2+} -ATPase (Lounsbury KM *et al.* 2000). En effet, plusieurs évidences supportent le fait que les DROs inactivent la pompe SERCA. La pompe SERCA fonctionne en transportant le Ca^{2+} contre son gradient de concentration à l'intérieur de la lumière du réticulum sarcoplasmique. Une étude de Grover et Samson a démontré, dans des fractions enrichies en membranes plasmiques et réticulum endoplasmiques d'artères

coronaires, que la xanthine/xanthine oxydase inactivait à la fois la pompe SERCA mais également la pompe calcique membranaire. La pré-incubation de ces fractions enrichies avec la SOD et non la catalase a prévenu ce phénomène; suggérant que le $\bullet\text{O}_2^-$, plutôt que le H_2O_2 ou le OH^- , serait responsable des effets observés (Grover AK *et al.* 1988). Mis à part le $\bullet\text{O}_2^-$, il été montré, dans les artères coronaires, que le H_2O_2 pouvait également inhiber de manière efficace l'entrée du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique en causant une inhibition de la pompe SERCA (Grover AK *et al.* 1992).

Considérant le fait que l' $\bullet\text{O}_2^-$ et le H_2O_2 possèdent des propriétés chimiques différentes, nous voulions comprendre les mécanismes à travers lesquels ces DROs pouvaient produire une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La déplétion du calcium du milieu extracellulaire a entièrement inhibé les réponses calciques après stimulation des CMLVs WKY et SHR avec le H_2O_2 et le LY83583 (un générateur d' $\bullet\text{O}_2^-$), suggérant que l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observée provenait principalement d'un influx du Ca^{2+} du milieu extracellulaire. La route primaire de l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire dans les CMLVs s'effectue à travers les canaux calciques voltage-dépendants, qui constituent une grande famille de protéines homologues catégorisée selon leurs cinétiques et leurs propriétés pharmacologiques. Les CMLVs expriment deux types de canaux calciques; les canaux calciques de type L et de type T. Les canaux calciques de type L ("Long-lasting Ca^{2+} channels") sont des canaux ioniques voltage-dépendants requis pour le couplage normal excitation-contraction dans les CMLVs, les cardiomyocytes et les cellules musculaires squelettiques. Ces canaux forment des complexes protéiques constitués de plusieurs sous-unités : la sous-unité α_1 qui forme

le pore du canal et les sous-unités β , $\alpha_2\delta$ et γ qui sont des protéines régulatrices. Il est maintenant très bien établi que c'est la sous-unité α_1 qui confère les propriétés fonctionnelles du canal. En effet, cette sous-unité régule la perméabilité au Ca^{2+} , l'inactivation du canal de manière Ca^{2+} -dépendante et l'inhibition du canal par les bloqueurs des canaux calciques (Sonkusare S *et al.* 2006). Les canaux calciques de type L sont des HVA "high voltage-activated". Lors de la dépolarisation des CMLVs, l'ouverture de ces canaux calciques de type L ($\text{Ca}_v1.2$) entraîne l'entrée du calcium dans le milieu intracellulaire et la contraction subséquente des CMLVs. Ainsi, ces canaux jouent un rôle déterminant dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression artérielle. Contrairement aux canaux calciques de type L, les canaux calciques de type T sont des LVA "low voltage-activated". En effet, ils sont caractérisés par leur activation et inactivation très lente. Les canaux de type T $\text{Ca}_v3.1$ et $\text{Ca}_v3.2$ sont exprimés dans le système cardiovasculaire, incluant les CMLVs. Même si beaucoup de recherche est effectuée sur les bases moléculaires de la régulation des canaux LVA, le rôle fonctionnel de ces canaux dans les CMLVs est encore très peu connu (Cribbs LL, 2006).

Dans nos études, l'incubation des CMLVs avec des inhibiteurs canaux calciques de type L (verapamil et diltiazem) et de type T (mibefradil) nous ont permis d'élucider si l'influx calcique observé après stimulation des cellules avec le H_2O_2 et le LY83583 s'effectuait à travers les canaux de type L et/ou de type T. De plus, l'utilisation des inhibiteurs nous a permis de déterminer si les mécanismes de l'entrée du Ca^{2+} étaient différents entre le H_2O_2 et LY83583. La pré-incubation des CMLVs, provenant des rats WKY et SHR, avec le verapamil et le diltiazem a produit une diminution significative de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par le H_2O_2 . Cependant, la pré-

incubation des cellules avec le mibefradil n'a produit aucune différence significative. Il est très important de mentionner que le mibefradil, bloqueur des canaux calciques LVA, n'est pas "spécifique" aux canaux calciques de type T. En effet, il a été démontré que le mibefradil inhibait d'autres canaux LVA tels que les canaux Na^{2+} voltage-dépendants et les canaux K^+ . Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par le H_2O_2 n'est pas médiée via les canaux calciques LVA.

Contrairement aux effets du H_2O_2 sur la signalisation calcique des CMLVs, les effets des inhibiteurs des canaux calciques sur les $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par $l'\bullet\text{O}_2^-$ étaient différents entre les CMLVs des rats WKY et SHR. En effet, les inhibiteurs des canaux calciques de type L et de type T ont diminué les $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induites par le LY83583 dans les CMLVs des rats WKY mais pas dans celles des rats SHR. Ces résultats démontrent que la signalisation calcique induite par $l'\bullet\text{O}_2^-$ est différemment régulée en hypertension artérielle. Il est possible qu'il existe une régulation différente des canaux calciques par les DROs. Néanmoins, ces résultats nécessitent plus de clarification.

Le fait que l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par le H_2O_2 est exagérée chez les SHR par rapport aux WKY, nous avons évalué l'expression des sous-unités α des canaux calciques de type L (α_{1C}) et de type T (α_{1G}) dans les artères mésentériques de rats WKY et SHR. L'ARNm des sous-unités α_{1C} et α_{1G} était significativement augmenté chez les SHR comparativement aux WKY. De plus, l'expression protéique des canaux calciques de type L était augmentée chez les SHR. De manière similaire à nos études, il a récemment été démontré qu'il y avait une régulation à la hausse (ARNm et protéine) de la sous-unité α_{1C} au niveau des artères mésentériques des SHR (Pratt PF *et al.* 2002). Ceci pourrait donc expliquer la l'exacerbation de la réponse calcique

observée entre les WKY et SHR après stimulation des CMLVs avec le H₂O₂. Étant donné que le Ca²⁺ est important pour la contraction vasculaire, l'ensemble de ces résultats suggère que les changements calciques redox-sensibles contribuent à l'altération du tonus vasculaire en hypertension artérielle. D'ailleurs, nos expériences de contractilité vasculaire ont démontré que les réponses contractiles des artères mésentériques au H₂O₂ étaient exagérées chez les SHR. De manière similaire, d'autres études ont démontré que le H₂O₂ induisait une augmentation de la contraction des artères de résistance et ceci à travers la production de thromboxane A₂ (Gao YJ *et al.* 2001). Il a été démontré que le H₂O₂ pouvait également induire une vasodilatation dans certains lits vasculaires. En effet, dans les artères coronaires, cérébrales et pulmonaires, le H₂O₂ induit une vasodilatation alors que dans l'aorte, le H₂O₂ induit une vasoconstriction (Burke TM *et al.* 1987; Iesaki T *et al.* 1999; Torrecillas G *et al.* 2001). Un des mécanismes à travers lequel le H₂O₂ pourrait induire la vasorelaxation des artères est par l'activation de la eNOS et par l'augmentation du NO au niveau des ECs. En effet, il a été démontré qu'une incubation prolongée du H₂O₂ dans les ECs induit une régulation à la hausse de l'expression et l'activité de la eNOS et une augmentation de la synthèse de tetrahydrobiopterine (Shimizu S *et al.* 2003). Les effets contradictoires du H₂O₂ sur la réactivité vasculaire dépendent du protocole expérimental et plus particulièrement de la concentration du H₂O₂ utilisé. Dans nos études, le H₂O₂ a été utilisé à une concentration de 10⁻⁴ mol/l. Cette concentration est supra-physiologique, mais il a été démontré que dans certaines situations pathologiques tels que l'ischémie/reperfusion, le diabète ou l'athérosclérose, les niveaux vasculaires de H₂O₂ peuvent atteindre des concentrations allant jusqu'au micro-molaire (Zulueta JJ *et al.* 1997; Lounsbury KM *et al.* 2000).

L'augmentation du calcium intracellulaire induite par le H_2O_2 ou par l'Ang II entraîne non seulement la contraction des CMLVs, mais est également responsable de l'activation de certaines protéines tyrosine kinases importantes dans la croissance cellulaire. En effet, la signalisation calcique et le calcium intracellulaire induit la phosphorylation de protéines serines et thréonines kinases telles que la PKC (Nishizuka Y, 1992) ou la Ca^{2+} /calmoduline protéine kinase (Braun AP *et al.* 1995). Ainsi, il a été démontré que la PKC et ses seconds messagers tels que le IP_3/Ca^{2+} , induisent l'activation de JAK2 par l'Ang II. De plus, il a été démontré que dans les CMLVs, l'activation de Pyk2, le substrat de Src, par l'Ang II est dépendant du Ca^{2+} et de la PKC (Sabri A *et al.* 1998).

Dans la deuxième étude, nous avons évalué la régulation de l'activité des MAP kinases par les DROs en hypertension artérielle (SHR) et déterminé les mécanismes intracellulaires à travers lesquels les MAP kinases sont activées par le H_2O_2 . Tel que décrit ci-dessus, les MAP kinases constituent une famille de protéines serines/thréonines kinases qui sont activées en réponse à plusieurs stimuli externes tels que les facteurs de croissance, les hormones, les peptides vasoactifs et le stress. Il est important de mentionner que même si nous et d'autres groupes avons démontré que les MAP kinases sont régulés par les DROs, celles-ci ne constituent pas des cibles directes des DROs. Parmi tous les dérivés réactifs de l'oxygène, nous avons étudié l'effet du H_2O_2 sur l'activation des MAP kinases car le H_2O_2 est perméable aux membranes cellulaires et est beaucoup plus stable que $l'\bullet O_2^-$ et le OH^- . Plusieurs études, y compris la nôtre, ont démontré que les MAP kinases sont activées par le H_2O_2 dans plusieurs types cellulaires incluant les CMLVs et les cardiomyocytes (Bass

AS *et al.* 1995; Touyz RM *et al.* 2003b; Ushio-Fukai M *et al.* 1998b). Cependant, très peu d'études ont comparé l'activation des MAP kinases par les H₂O₂ dans les CMLVs provenant des rats spontanément hypertendus en comparaison avec les rats normotendus WKY. Chez les SHR, l'augmentation de l'activation des MAP kinases par le H₂O₂ pourrait avoir des conséquences importantes sur la croissance des CMLVs et sur le remodelage vasculaire en hypertension artérielle puisqu'il a été établi que ce modèle exhibe à l'état basal un plus grand niveau de stress oxydant dans les vaisseaux (Zalba G *et al.* 2000).

Les mécanismes en amont de l'activation des MAP kinases par le H₂O₂ ne sont pas encore très clairs. Puisque la PKC, les protéines tyrosines kinases non récepteurs et récepteurs sont impliqués dans l'activation des MAP kinases par l'Ang II, nous voulions donc savoir si ces protéines sont également impliquées dans l'activation des MAP kinases par le H₂O₂. Utilisant des agents pharmacologiques, nous sommes arrivés à la conclusion que l'activation d'ERK1/2 et de p38 MAP kinase par le H₂O₂ est PKC-indépendante et protéines tyrosines kinases-dépendante. Tandis que, uniquement les récepteurs tyrosines kinases (EGR-R, PDGF-R et IGF-R) sont importants dans l'activation de p38 MAP kinases par le H₂O₂, l'activation de ERK1/2 implique les protéines tyrosines kinases de type récepteur et non-récepteur.

Les PKC constituent une famille de protéines kinases comprenant au moins 12 isoformes. Ces isoformes sont classifiés sous trois catégories (classiques, nouveaux et atypiques) sur la base de leurs structures et de leurs habilités à lier les cofacteurs (Liu WS *et al.* 1998). Une étude récente a démontré que les isoformes classiques (α , β I et γ), nouveaux (δ et ϵ) et atypique (PKC ζ) de la PKC étaient phosphorylés sur leurs résidus tyrosines suite à la stimulation des cellules avec le H₂O₂ (Konishi H *et al.*

1997). Cependant, l'implication de PKC dans la phosphorylation des MAP kinases par le H_2O_2 est contradictoire. En effet, dépendamment des types cellulaires étudiés et des inhibiteurs des PKC utilisés, il a été démontré que l'activation d'ERK1/2 et p38 MAP Kinase par le H_2O_2 était PKC-dépendante ou indépendante. Dans les myocytes cardiaque de rats néonataux et dans les cellules musculaires lisses pulmonaires (Clerk A *et al.* 1998; Zhang J *et al.* 1998), il a été démontré que l'activation des MAP kinases par le H_2O_2 était PKC dépendante, alors que dans d'autres études et de manière similaire à notre étude, les inhibiteurs de la PKC n'ont pas affecté l'activité des MAP kinases induite par le H_2O_2 dans les CMLVs (Taher MM *et al.* 1998). Les raisons qui pourraient expliquer ces résultats contradictoires incluent le fait qu'il est possible que PKC soit différemment régulée d'un type cellulaire à l'autre et que les inhibiteurs utilisés dans ces études affectent les isoformes différents de la PKC.

Mis à part la PKC, nous avons étudié, utilisant des agents pharmacologiques, l'implication des NRTK (Src et JAK2) et RTK (EGF-R, PDGF-R et IGF-R) dans l'activation des MAP kinases par le H_2O_2 . JAK et Src sont deux familles de protéines tyrosines kinases de type non-récepteur qui participent aux signaux de transduction menant à la prolifération des CMLVs induite par l'Ang II; et qui agissent sur plusieurs substrats similaires incluant STAT1, STAT3, Raf-1 et Shc. (Sayeski PP *et al.* 1999). La famille des protéines tyrosines kinases JAK inclue JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Ces protéines de poids moléculaire de 130 kDa induisent la transcription des gènes à travers les transducteurs de signal et activateurs de la transcription STATs. De plus, ils activent les voies de signalisation classiques telle que la voie Shc/Grb2/Sos et Raf-1. Comme mentionné ci-dessus, ces voies de signalisation sont impliquées dans l'hypertrophie, prolifération et migration des CMLVs (Figure 5). De manière

similaire, la famille Src (55-62 kDa) induit la croissance des CMLVs en signalant à travers Shc/Grb2/Sos et STAT. Dans nos études, nous démontrons qu'à la fois JAK2 et Src sont impliquées dans l'activation des MAP kinases par le H₂O₂. Plusieurs études ont déjà démontré que les RTK sont activés par les DROs et que l'activation des RTK induit la production des DROs à travers l'activation de la NAD(P)H oxydase (Yang E *et al.* 2000; Touyz RM *et al.* 2003b). Ici, nous démontrons que l'EGF-R, le PDGF-R et l'IGF-R sont impliqués dans l'activation par le H₂O₂ d'ERK1/2 mais pas de p38 MAP kinase. Il est donc possible que les voies de signalisation à travers lesquels le H₂O₂ active p38 MAP kinase diffèrent de celles de l'activation de ERK1/2. Les points faibles de cette étude incluent le fait qu'il est possible que les inhibiteurs pharmacologiques utilisés pour inhiber la PKC, les RTK et les NRTK ne soient pas si spécifiques dans les sens ou il se pourrait qu'ils inhibent d'autres protéines que celles pour lesquels ils ont été utilisées. D'autres méthodes, tels que l'utilisation des oligonucleotéides ou encore des siRNA (small interference RNA) s'avèrent être plus spécifiques.

En plus de leur rôle dans la croissance cellulaire et la synthèse protéique, de nouvelles données indiquent que les MAP kinases et protéines tyrosines kinases jouent un rôle important dans la contraction cellulaire induite par l'Ang II et par le H₂O₂. En effet, des études provenant de notre laboratoire ont démontré que dans les CMLVs provenant d'artères de résistances mésentériques, les protéines tyrosines kinases ainsi que la cascade de signalisation d'ERK jouent un rôle important dans la contraction cellulaire. Nous avons démontré que les voies de signalisation de MEK/ERK sont impliquées dans la contraction cellulaire suite à l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Le PD98059 (inhibiteur de MEK) et le Tyrphostin A-23 (inhibiteur des tyrosines

kinases) atténuent la contraction des cellules induites par l'Ang II (Touyz RM *et al.* 1999a). P38 MAP kinase est également impliquée dans les effets contractiles induits par l'Ang II dans les CMLVs. Les mécanismes à travers lesquels l'activation des MAP kinases module la contraction des CMLVs sont à clarifier mais il semblerait que la phosphorylation de Hsp27 par p38 MAP kinase, suite à la stimulation des CMLVs par l'Ang II, induit le changement de conformation de Hsp27 ce qui dissocie cette dernière de sa liaison aux filaments d'actine. Cette dissociation est responsable de la contraction des CMLVs (Meloche S *et al.* 1999). La deuxième possibilité est que l'activation de p38 MAP kinase par l'Ang II induit la phosphorylation de « MAP-kinase activated protein kinase 2 » (MAPKAP kinase 2) qui est capable de phosphoryler la chaîne légère de la myosine de manière directe (Komatsu S *et al.* 1996). En plus de leurs contributions dans les effets contractiles de l'Ang II, les MAP kinases, telles que ERK et p38 MAP kinases, et les protéines tyrosines kinases, telle que Src, sont impliquées dans la contraction aortique induite par le H₂O₂ (Thakali K *et al.* 2007).

Finalement, nous avons testé l'hypothèse que l'augmentation de la phosphorylation des MAP kinases induite par les DROs était associée à une augmentation de l'oxydation des protéines tyrosines phosphatases. En effet, les niveaux cellulaires de phosphotyrosines sont régulés par l'activité antagoniste des protéines tyrosines kinases et des protéines tyrosines phosphatases. Dans ce sens, utilisant la méthode du "In gel" PTP assai, nous avons déterminé, pour la première fois, que l'Ang II induisait l'oxydation et l'inactivation réversible d'au moins trois PTPs dans les CMLVs. De manière intéressante, l'oxydation de certaines PTPs était

augmentée dans les CMLVs des rats SHR comparativement à celles des rats WKY. Ces études suggèrent que l'Ang II, à travers la production des DROs, induit l'inactivation par oxydation des PTPs dans les CMLVs. De manière similaire à notre étude, Sullivan *et al.* ont démontré que l'inhibition des PTPs par le H₂O₂ était réversible dans les cellules Her14 (Sullivan SG *et al.* 1994). Aussi, le H₂O₂ produit dans les cellules stimulées avec le TNF- α induit l'inactivation des "mitogen-activated protein kinase phosphatases", PTPs importantes dans la signalisation intracellulaire des MAP kinases.

De plus, une multitude d'études ont démontré que la production des DROs en réponse la stimulation des cellules avec des facteurs de croissance tels que l'EGF ou le PDGF et des rayons UV (UVC, UVB et UVA) induisait l'inactivation/oxydation des PTPs *in vivo* (Lee SR *et al.* 1998; Gross S *et al.* 1999).

Parmi les protéines oxydées par l'Ang II dans les cellules vasculaires, nous avons identifié et étudié la régulation de la protéine tyrosine phosphatase 2 (SHP-2), également nommée PTP1D, PTP2C, Syp, SH-PTP2, SH-PTP3. SHP-2 (68 kD) est une PTP cytosolique, possédant deux domaines SH2 du coté N-terminal ("Src-homology domain"), qui est exprimée de manière ubiquitaire et qui joue un rôle important dans la signalisation induite par les facteurs de croissance et les intégrines. De manière intéressante, il a été démontré que SHP-2 exerce ses effets en se liant aux résidus tyrosines des protéines tyrosines kinases de type récepteur tels que l'IGF-1R ou le PDGF-R β . Les mécanismes de l'action de SHP-2 sont complexes puisqu'il a été démontré que cette phosphatase pouvait réguler les protéines tyrosines kinases de manière positive ou négative; de plus, plusieurs des cibles de SHP-2 sont à ce jour inconnues (Feng GS, 1999). SHP-2 régule plusieurs patrons de signalisations,

importants dans la fonction cellulaire, incluant la croissance, l'adhésion et la motilité cellulaire. Dans nos études, nous voulions premièrement savoir si SHP-2 était inactivée par oxydation suite à la stimulation des CMLVs avec l'Ang II ou le H₂O₂, et deuxièmement comparer la régulation de cette PTP en hypertension artérielle. Puisque les niveaux de phosphorylation des résidus tyrosines étaient augmentés par les DROs dans le modèle SHR, nous suggérons pour la première fois que cette augmentation est associée à une inhibition par oxydation de certaines protéines tyrosines phosphatases (tel que SHP-2) impliquées dans les patrons de signalisation de l'Ang II menant à la croissance des CMLVs en hypertension artérielle (Figure 7).

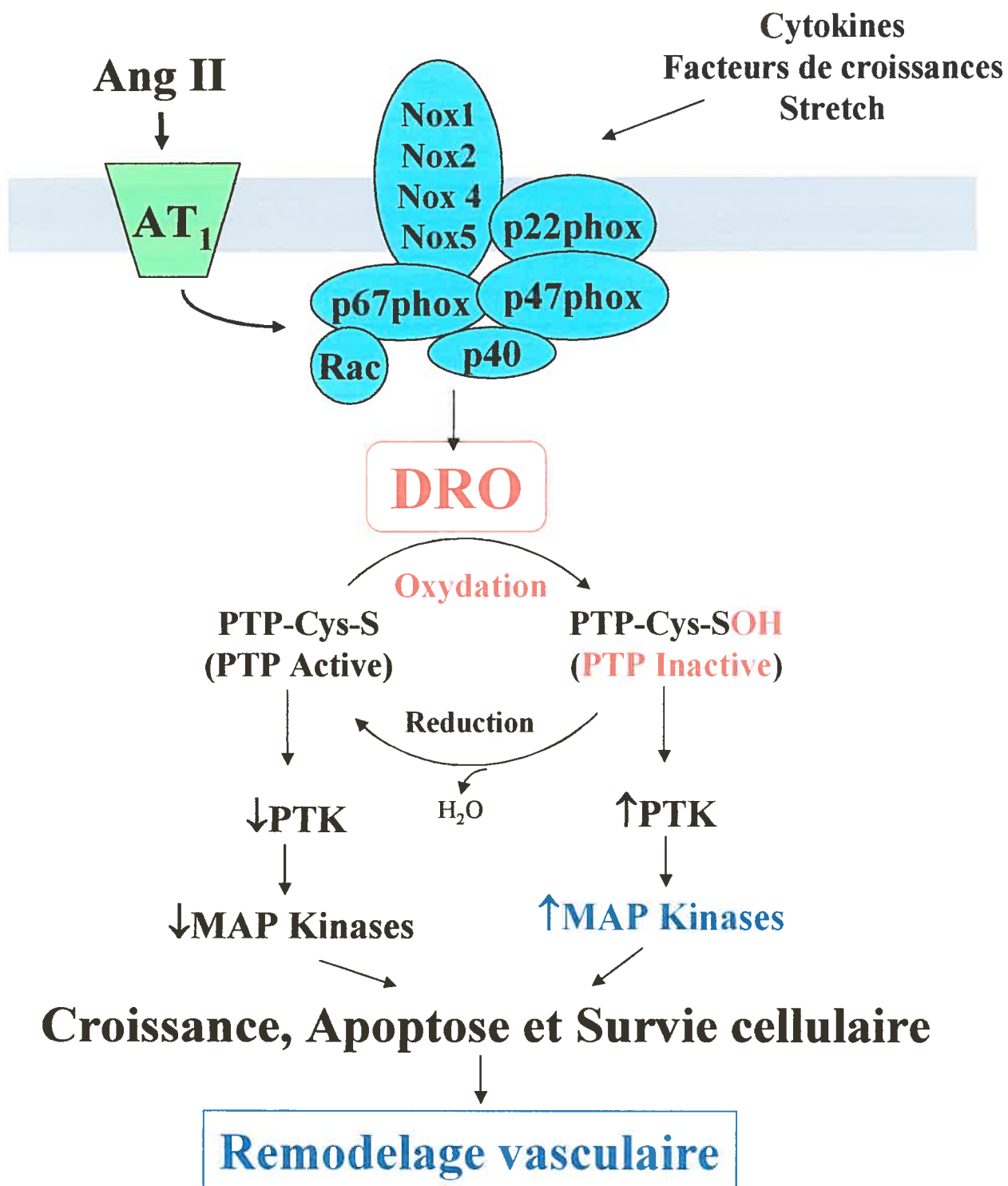


Figure 7. Modification redox des protéines tyrosines phosphatases dans les cellules musculaires lisses vasculaire. PTP= protéines tyrosines phosphatases, PTK= protéines tyrosines kinase
Adapté de Touyz RM *et al. Histochem Cell Biol.* 2004a

Utilisant un anticorps reconnaissant la forme oxydée des PTPs (Persson C *et al.* 2005), nous avons pour la première fois détecté l'oxydation de SHP-2 suite à la stimulation des cellules avec l'Ang II. D'autres études ont démontré que SHP-2 pouvait être oxydée dans les cellules fibroblastes Rat 1 suite à la stimulation par le PDGF (Meng TC *et al.* 2002). Mis à part les PTPs cytosoliques, il a été démontré que les PTPs de type récepteur sont également des cibles de l'oxydation par les DROs. Effectivement, l'oxydation du résidu cystéine du domaine intracellulaire D2 des PTPs récepteurs (tel que PTP α) change la conformation du domaine D2 de la PTP affectant ainsi la signalisation à travers ce récepteur (Blanchetot C *et al.* 2002).

L'oxydation des PTPs par les DROs induit l'inactivation de ces dernières ce qui contribuerait à l'augmentation la signalisation intracellulaire des protéines tyrosines kinases induite par l'Ang II et les facteurs de croissance. En effet, il a été décrit que l'oxydation réversible de la PTP1B par l'EGF était associée à une inhibition de l'activité de la phosphatase. De plus, la production des DROs induite par l'EGF ou l'insuline coïncide avec l'inhibition de l'activité de la PTP1B. Ceci est particulièrement significatif puisque plusieurs études ont démontré que la PTP1B était un régulateur négatif de la signalisation intracellulaire médié par l'insuline dans les adipocytes et que l'inhibition de la PTP par le H₂O₂ était associé à une augmentation des cascades de signalisations médiées par l'insuline (Bae YS *et al.* 1997; Mahadev K *et al.* 2001). Dans ce sens, nous voulions comprendre l'implication de l'inactivation de SHP-2 dans les patrons de signalisation de l'Ang II menant à la croissance des CMLVs en hypertension artérielle. L'expression et la phosphorylation basale de SHP-2 était réduite chez les SHR comparativement aux WKY. De plus, SHP-2 est phosphorylée par l'Ang II via le récepteur AT-1 et la NAD(P)H oxydase et

l'amplitude de phosphorylation de SHP-2 est diminuée chez les SHR. Nous démontrons également que la régulation à la baisse de SHP-2 était associée à une augmentation significative de la phosphorylation de AKT par l'Ang II dans les cellules vasculaires SHR et WKY. AKT ou protéine kinase B joue un rôle essentiel dans la régulation des fonctions cellulaires tels la croissance cellulaire, l'expression génique, la survie cellulaire, la synthèse protéique et le transport de glucose (Somanath PR *et al.* 2006). AKT inhibe la "glycogen synthase kinase 3" et active la kinase ribosomale S6 ainsi que les facteurs de transcriptions AP-1 et E2F, tous impliqués dans la prolifération et croissance des cellules vasculaire (Figure 5). De manière similaire aux MAP kinases, à la fois le H₂O₂ exogène et l'Ang II activent AKT dans les CMLVs (Ushio-Fukai M *et al.* 1999b). De plus, la phosphorylation de AKT par l'Ang II est inhibée par le DPI, suggérant ainsi l'importance des DROs, dérivés de la NAD(P)H, dans l'activation de AKT par l'Ang II. Nos études démontrent l'importance de la PTP SHP-2 dans les patrons de signalisations intracellulaires de l'Ang II et identifient les PTPs comme des cibles directes des DROs suite à la stimulation des CMLVs avec l'Ang II. Ces résultats suggèrent que l'oxydation des PTPs en hypertension artérielle est un mécanisme qui pourrait contribuer de manière très significative au remodelage vasculaire associé aux maladies cardiovasculaires.

Akt est activée par plusieurs facteurs de croissance et cytokines. Le patron de son activation inclut sa phosphorylation et translocation à la membrane (Bellacosa A *et al.* 1998). Le patron de signalisation typique de l'activation d'Akt est médié par l'activation de récepteurs tyrosines kinases tels que le récepteur à l'insuline ou l'IGF-

1R. La stimulation du récepteur induit la phosphorylation de certains substrats tels que le substrat du récepteur à l'insuline (IRS1 ou IRS2). La phosphorylation de ce substrat entraîne la liaison de protéines spécifiques possédant un domaine SH2. Parmi ces protéines, la PI3K se lie à l'IRS (Burgering BM *et al.* 1995). Akt joue un rôle important comme médiateur de la fonction biologique de l'insuline. En effet, la signalisation d'Akt joue un rôle majeur dans le métabolisme du glucose et la PI3K est responsable, en partie, à la stimulation du transporteur du glucose (GLUT4) par l'insuline. Le rôle d'Akt et de PI3K dans ce processus se produit à deux différents niveaux. Premièrement, suite à la stimulation par l'insuline, Akt induit la translocation des vésicules contenant GLUT4 des stores intracellulaires vers la membrane plasmatique (Kohn AD *et al.* 1996). GLUT4 induit l'entrée du glucose dans la cellule. En plus de la translocation de GLUT4, Akt promeut la synthèse de glycogène suite à l'inactivation de la glycogène synthase kinase 3 (Cross DA *et al.* 1995). Considérant le rôle majeur de la PI3K-Akt dans les voies de signalisation de l'insuline, il n'est pas surprenant que ces voies de signalisation aient été étudiées dans le phénomène de résistance à l'insuline observée dans le diabète de type II. Il a ainsi été suggéré que la phosphorylation d'Akt, la translocation de GLUT 4 suite à la stimulation des cellules avec l'insuline, est détériorée chez les patients et rats insulino-résistants (Krook A *et al.* 1997 ; Rondinone CM *et al.* 1999 ; Song XM *et al.* 1999 ; Tremblay F *et al.* 2001).

Selon les résultats obtenus dans nos études, l'expression et la phosphorylation basale de SHP-2 est diminuée chez le SHR. De plus, après avoir mimé cette carence signalétique en sous-régulant l'expression de SHP-2, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation d'Akt chez les CMLVs de SHR stimulées à l'Ang

II. Pourtant, en plus d'être spontanément hypertendu, le modèle SHR est un modèle insulino-résistant. La résistance à l'insuline dans ce modèle a été décrite au niveau du tissu adipeux et squelettique. De plus, une diminution de la phosphorylation du récepteur de l'insuline et de l'IRS1 ainsi qu'une suppression de la translocation du transporteur du glucose dans le tissu adipeux fut décrit (Shimamoto K *et al.* 2006). Pour expliquer nos résultats, il est important de se rappeler que les PTPs régulent de manière négative la signalisation de l'insuline via la déphosphorylation du récepteur à l'insuline. Ainsi, l'activation du récepteur à l'insuline par autophosphorylation est réversiblement régulé par plusieurs PTPs incluant SHP-2 et la protéine tyrosine phosphatase α . Mais ce n'est que récemment qu'il a été démontré de la protéine tyrosine phosphatase B (PTP1B) était la PTP majeure responsable de régulation négative du récepteur à l'insuline (Zhang ZY, 2001). De plus, il a été prouvé que les souris déficientes en PTP1B exhibent une amélioration de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Liu G, 2003). Par contre, d'autres études ont démontré que l'inhibition de SHP-2, en utilisant des souris transgéniques sur-exprimant un dominant négatif SHP-2, a détérioré la signalisation intracellulaire de l'insuline dans le muscle et foie. Ceci a été traduit par une diminution de la phosphorylation d'IRS1, d'Akt et de PI3K. Ainsi, une augmentation de la résistance à l'insuline fut observée (Maegawa H *et al.* 1999). Dans notre modèle, le rôle physiologique de l'augmentation de la phosphorylation d'Akt par l'Ang II suite à la sous-régulation de SHP-2 est à déterminer. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction de l'Ang II et de l'insuline dans l'activation d'Akt induite par l'Ang II dans le tissu adipeux et squelettique, qui représentent les tissus les plus affectés par la résistance à l'insuline. De plus, il serait intéressant de déterminer si d'autres phosphatases, telles que PTP1B, PTEN ou

SHIP2, sont inactivés par oxydation suite à la stimulation des CMLVs par l'Ang II. Il a en effet été déterminé que, de manière similaire à la sous-régulation de la PTP1B, la régulation à la baisse de PTEN ou SHIP2 ont des effets bénéfiques sur le métabolisme du glucose et de la résistance à l'insuline (Sasaoka T *et al.* 2006).

CONCLUSION

L'ensemble de nos travaux ont permis de démontrer que les DROs tels que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène constituent des médiateurs importants dans les processus de signalisation intracellulaires contribuant aux dommages vasculaires liées à l'hypertension artérielle.

Dans les CMLVs, les DROs augmentent les concentrations de calcium intracellulaires, principalement via l'influx du calcium à travers les canaux calciques de type L. De plus, le H_2O_2 induit une augmentation des concentrations de calcium intracellulaires et de la contraction des artères de résistance chez les SHR. L'augmentation de la signalisation calcique chez le SHR pourrait s'expliquer par le fait qu'il y a une hausse de l'expression génique et protéique des canaux calciques de type L dans ce modèle. En plus d'influencer le tonus vasculaire, le H_2O_2 influence l'activation des MAP kinases, protéines qui jouent un rôle important dans les processus intracellulaires menant à l'hypertrophie et à la prolifération des CMLVs. Nos résultats indiquent que les MAP kinases ERK1/2 et p38 MAP kinases sont redox-dépendantes et que leur activation est régulée à la hausse dans le modèle hypertendu SHR. Ces études identifient les protéines tyrosines kinases mais pas la PKC comme protéines importantes dans l'activation d'ERK1/2 et de p38 MAP kinase par le H_2O_2 exogène dans les CMLVs. De plus, utilisant des approches biochimiques, pharmacologiques et moléculaires, nous identifions clairement et pour la première fois que l'Ang II induit l'augmentation de l'oxydation de plusieurs PTPs, incluant SHP-2, dans les cellules musculaires lisses vasculaires des rats SHR. Cette oxydation constitue un mécanisme nouveau et important dans la régulation des PTPs dans les

cellules vasculaires. En effet, l'oxydation des PTPs sur leurs résidus cystéines est associée à un changement de conformation et de structure des PTPs, qui a pour conséquence l'inactivation et l'inhibition de leur activité phosphatase. Finalement, nous démontrons que SHP-2 est associé à l'activation de AKT par l'Ang II et qu'il est possible que l'oxydation/inactivation de SHP-2 par l'Ang II contribuerait à l'augmentation des voies de signalisations menant à la croissance des CMLVs en hypertension artérielle.

Bien que nos travaux nous aient permis d'identifier certaines cibles de l'action des DROs dans les CMLVs en hypertension artérielle, plusieurs questions restent à clarifier. En effet, les modifications thiol redox-dépendantes sur le contrôle de la signalisation intracellulaire des protéines importantes dans l'hypertrophie et prolifération des CMLVs sont à identifier. De manière plus significative, il serait important d'étudier les conséquences physiologiques de l'oxydation des protéines par les DROs dans les pathologies cardiovasculaires associées au remodelage vasculaire tel que l'hypertension artérielle. La découverte de la régulation des PTPs par oxydation constitue une ouverture pour l'identification de nouvelles approches pharmacologiques permettant de traiter des situations de dérégulation de la signalisation phosphotyrosine dans certaines pathologies.

Une meilleure compréhension de ces événements pourrait nous éclaircir sur les processus de la dysfonction vasculaire en hypertension artérielle et pourrait nous aider à identifier des cibles thérapeutiques potentielles dans la prévention et le traitement de l'hypertension artérielle.

BIBLIOGRAPHIE

Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 1990;249(4973):1157-61.

Abe J, Kusuhashi M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(28):16586-90.

Adlam D, Bendall J, de Bono JP, Alp NJ, Khoo J, Nicoli T, Yokoyama M, Kawashima S, Channon KM. Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP Cyclohydrolase I double transgenic mice. *Exp Physiol*. 2006 Sep 28

Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2004;109(2):227-33.

Allen RT, Krueger KD, Dhume A, Agrawal DK. Sustained Akt/PKB activation and transient attenuation of c-jun N-terminal kinase in the inhibition of apoptosis by IGF-1 in vascular smooth muscle cells. *Apoptosis*. 2005;10(3):525-35.

Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.

Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE. Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension*. 1996;28(6):1047-54.

Aminbakhsh A, Mancini J. Chronic antioxidant use and changes in endothelial dysfunction: a review of clinical investigations. *Can J Cardiol*. 1999;15(8):895-903.

Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;77(1):29-36.

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2002;397(2):342-4.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272(1):217-21.

Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*. 1998;17(3):313-25.

Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem*. 2003;278(6):3510-3.

Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):L829-36.

Berkels R, Egink G, Marsen TA, Bartels H, Roesen R, Klaus W. Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. *Hypertension*. 2001;37(2):240-5.

Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 1999;274(49):34543-6.

Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev.* 2001;81(3):999-1030.

Berry C, Hamilton CA, Brosnan MJ, Magill FG, Berg GA, McMurray JJ, Dominiczak AF. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation.* 2000;101(18):2206-12.

Blanchetot C, Tertoolen LG, den Hertog J. Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress. *EMBO J.* 2002;21(4):493-503.

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1976;156(2):435-44.

Braun AP, Schulman H. A non-selective cation current activated via the multifunctional Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. *J Physiol.* 1995;488 (Pt 1):37-55.

Braun-Dullaes RC, Mann MJ, Ziegler A, von der Leyen HE, Dzau VJ. A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest.* 1999;104(6):815-23.

Brown MR, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;85(6):524-33.

Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995;376(6541):599-602.

Burke TM, Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol.* 1987;252(4 Pt 2):H721-32.

Cakir Y, Ballinger SW. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(5-6):726-40.

Carey RM. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension*. 2005;45(5):840-4.

Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, Ramponi G. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32554-60.

Castoldi G, Di Gioia CR, Pieruzzi F, D'Orlando C, Van De Greef WM, Busca G, Sperti G, Stella A. ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(2):H635-43.

Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2003;16(11 Pt 1):973-8.

Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Lefebvre PJ. Anti-oxidants show an anti-hypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin Sci (Lond)*. 1991;81(6):739-42.

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, Wilcox CS. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*. 2002;39(2):269-74.

Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol*. 1997;272(3 Pt 2):F299-304.

Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):606-11.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001;269(1-2):131-40.

Chockalingam A, Campbell NR, Fodor JG. Worldwide epidemic of hypertension. *Can J Cardiol*. 2006;22(7):553-5.

Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J*. 1998;333(Pt 3):581-9.

Cline WH Jr. Role of released catecholamines in the vascular response to injected angiotensin II in the dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;216(1):104-10.

Clubb FJ Jr, Bell PD, Kriseman JD, Bishop SP. Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest*. 1987;56(2):189-97.

Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res*. 1999;85(10):940-9.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002;417(6891):822-8.

Cribbs LL. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium*. 2006;40(2):221-30.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.

Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Effects of chronic excess salt ingestion. Further demonstration that genetic factors influence the development of hypertension: evidence from experimental hypertension due to cortisone and to adrenal regeneration. *J Exp Med*. 1965;122(3):533-45.

Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*. 2006;98(4):463-71.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13(22):2905-27.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239-52.

deBlois D, Orlov SN, Hamet P. Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001;15(6):539-45.

Delva P, Lechi A, Pastori C, Degan M, Sheiban I, Montesi G, Pea M, Meneguzzi A, Menegazzi M. Collagen I and III mRNA gene expression and cell growth potential of skin fibroblasts in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2002;20(7):1393-9.

Den Hertog J, Groen A, van der Wijk T. Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. *Arch Biochem Biophys*. 2005;434(1):11-5.

Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*. 1998;37(16):5633-42.

Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling KK. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(5):845-54.

Dickhout JG, Lee RM. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 29(3):781-9.

Diep QN, El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 2001; 37: 604–608.

Digiesi V, Lenuzza M, Digiesi G. Prospects for the use of antioxidant therapy in hypertension. *Ann Ital Med Int*. 2001;16(2):93-100.

Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(4):F619-28.

Dreher D, Jornot L, Junod AF. Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca²⁺ stores and protein synthesis in human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76(3):388-95.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.

Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Huang A, Frei B, Keaney JF Jr, Vita JA. Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet*. 1999;354(9195):2048-9.

Eguchi S, Inagami T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept*. 2000;91(1-3):13-20.

Feld LG, Van Liew JB, Galaske RG, Boylan JW. Selectivity of renal injury and proteinuria in the spontaneously hypertensive rat. *Kidney Int.* 1977;12(5):332-43.

Feng GS. Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res.* 1999;253(1):47-54.

Ferrario CM. Angiotension-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol.* 1998;11(6):278-83.

Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006;98(1):121-8.

Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(4):499-507.

Ford CM, Li S, Pickering JG. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(8):1843-51.

Frohlich ED, Tarazi RC, Dustan HP. Clinical-physiological correlations in the development of hypertensive heart disease. *Circulation.* 1971;44(3):446-55.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18515-7.

Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clin Sci (Lond).* 1997;92(4):361-5.

Gallinat S, Busche S, Raizada MK, Summers C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278(3):E357-74.

Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol.* 2001;134(8):1639-46.

Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension.* 1994;24(5):531-7.

Gaziano JM, Manson JE, Branch LG, Colditz GA, Willett WC, Buring JE. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Ann Epidemiol.* 1995;5(4):255-60.

Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1992;90(2):456-61.

GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet.* 1999;354(9177):447-55.

Godfraind T. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1464):2259-72.

Gonzalez-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yague S, Jimenez S, Bragado R, Alvarez-Arroyo MV. Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(3):392-8.

Gotoh Y, Cooper JA. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17477-82.

Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2175-83.

Gross S, Knebel A, Tenev T, Neininger A, Gaestel M, Herrlich P, Bohmer FD. Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999;274(37):26378-86.

Grover AK and Samson SE. Effect of superoxide radical on Ca^{2+} pumps of coronary artery. *Am J Physiol*. 1988, 255:C297-C303

Grover AK, Samson SE, Formin VP. Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol*. 1992, 263:H537-H543.

Grover AK, Samson SE, Fomin VP, Werstiuk ES. Effects of peroxide and superoxide on coronary artery: ANG II response and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *Am J Physiol*. 1995;269(3 Pt 1):C546-53.

Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):C294-301.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(5):335-46.

Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV Jr, Scheel KW, Manning RD Jr, Norman RA Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med.* 1972;52(5):584-94.

Halaban R. Rb/E2F: a two-edged sword in the melanocytic system. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24(2):339-56.

Hamet P, deBlois D, Dam TV, Richard L, Teiger E, Tea BS, Orlov SN, Tremblay J. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74(7):850-61.

Hanna IR, Hilenski LL, Dikalova A, Taniyama Y, Dikalov S, Lyle A, Quinn MT, Lassegue B, Griendling KK. Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(10):1542-9.

Hasdai D, Gibbons RJ, Holmes DR Jr, Higano ST, Lerman A. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. *Circulation.* 1997;96(10):3390-5.

Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993;21(4):391-7.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993;75(2):241-51.

Hoffmann S, Krause T, van Geel PP, Willenbrock R, Pagel I, Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH, Lindschau C, Paul M, Inagami T, Ganten D, Urata H. Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 2001;79(10):601-8.

Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1998;97(3):268-75.

Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*. 1987;10(5):512-6.

Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM, Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrite and H₂O₂. *Am J Physiol*. 1999;277(3 Pt 2):H978-85.

Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL, Ferrario CM. Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(3):H1013-9.

Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2004;17(7):597-603.

Imai G, Satoh T, Kumai T, Murao M, Tsuchida H, Shima Y, Ogimoto G, Fujino T, Kobayashi S, Kimura K. Hypertension accelerates diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, a model of type 2 diabetes mellitus, via mitogen-activated protein kinase cascades and transforming growth factor-beta1. *Hypertens Res*. 2003;26(4):339-47.

Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999a;100(22):2267-75.

Intengan HD, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension*. 1999b;33(1 Pt 2):569-74.

Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):581-7.

Iwai K, Drake SK, Wehr NB, Weissman AM, LaVaute T, Minato N, Klausner RD, Levine RL, Rouault TA. Iron-dependent oxidation, ubiquitination, and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):4924-8.

Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2006;35(3):469-90, vii.

Jin L, Ying Z, Hilgers RH, Yin J, Zhao X, Imig JD, Webb RC. Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006a;318(1):288-95.

Jin L, Beswick RA, Yamamoto T, Palmer T, Taylor TA, Pollock JS, Pollock DM, Brands MW, Webb RC. Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*. 2006b;57(3):343-57.

Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11848-52.

Karam H, Heudes D, Gonzales MF, Loffler BM, Clozel M, Clozel JP. Respective role of humoral factors and blood pressure in aortic remodeling of DOCA hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1996;9(10 Pt 1):991-8.

Kassler-Taub K, Littlejohn T, Elliott W, Ruddy T, Adler E. Comparative efficacy of two angiotensin II receptor antagonists, irbesartan and losartan in mild-to-moderate hypertension. Irbesartan/Losartan Study Investigators. *Am J Hypertens*. 1998;11(4 Pt 1):445-53.

Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J*. 1997;16(23):7054-66.

Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998;395(6703):713-6.

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(3):893-901.

Klahr S, Morrissey J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(3 Suppl 1):S3-7.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31372-8.

Komatsu S, Hosoya H. Phosphorylation by MAPKAP kinase 2 activates Mg(2+)-ATPase activity of myosin II. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;223(3):741-5.

Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(21):11233-7.

Krens SF, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett.* 2006;580(21):4984-90.

Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes.* 1997;46(12):2110-4.

Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1996;334(18):1156-62.

Laffer CL, Bolterman RJ, Romero JC, Elijevich F. Effect of salt on isoprostanes in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension.* 2006;47(3):434-40.

Lahera V, Salazar J, Salom MG, Romero JC. Deficient production of nitric oxide induces volume-dependent hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1992;10(7):S173-7.

Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension.* 2002;40(4):511-5.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111(8):1201-9.

Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol.* 1995;48(4):601-9.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(2):R277-97.

Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):852-60.

Latini R, Masson S, Staszewsky L, Maggioni AP. Valsartan for the treatment of heart failure. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5(1):181-93.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997;95(3):588-93.

Lawler JE, Sanders BJ, Chen YF, Nagahama S, Oparil S. Hypertension produced by a high sodium diet in the borderline hypertensive rat (BHR). *Clin Exp Hypertens A*. 1987;9(11):1713-31.

Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15366-72.

Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20336-42.

Leenen FH, de Jong W. A solid silver clip for induction of predictable levels of renal hypertension in the rat. *J Appl Physiol*. 1971;31(1):142-4.

Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med*. 2005;146(3):160-73.

Li J, Li W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite-induced relaxation in isolated rat aortic rings and mechanisms of action. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;209(3):269-76.

Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem*. 2003;278(14):12094-100.

Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*. 2003;25(1):17-24.

Liu G. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition: opportunities and challenges. *Curr Med Chem*. 2003;10(15):1407-21.

Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*. 1998;10(8):529-42.

Liu Y, Min W. Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res*. 2002;90(12):1259-66.

Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(9):1362-9.

Maegawa H, Hasegawa M, Sugai S, Obata T, Ugi S, Morino K, Egawa K, Fujita T, Sakamoto T, Nishio Y, Kojima H, Haneda M, Yasuda H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J Biol Chem*. 1999;274(42):30236-43.

Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21938-42.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002;192(1):1-15.

McCubbin JW, DeMoura RS, Page IH, Olmsted F. Arterial hypertension elicited by subpressor amounts of angiotensin. *Science*. 1965;149(690):1394-5.

Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H741-51.

Meng TC, Fukada T, Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*. 2002;9(2):387-99.

Mettimano M, Romano-Spica V, Ianni A, Specchia M, Migneco A, Savi L. AGT and AT1R gene polymorphism in hypertensive heart disease. *Int J Clin Pract*. 2002;56(8):574-7.

Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Palatresi S, Bencini C, Del Vecchio C, Mansueto G, Arosio E, Santonastaso CL, Lechi A, Morganti A, Patrono C. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation*. 2002;106(22):2800-5.

Moreno MU, Jose GS, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2006;24(7):1299-306.

Mullins LJ, Bailey MA, Mullins JJ. Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective. *Physiol Rev*. 2006;86(2):709-46.

Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res*. 1985;57(5):794-800.

Nabha L, Garbern JC, Buller CL, Charpie JR. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2005;27(1):71-82.

Napoli C, Sica V, de Nigris F, Pignalosa O, Condorelli M, Ignarro LJ, Liguori A. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J*. 2004;148(1):e5.

Nicholls MG, Richards AM, Agarwal M. The importance of the renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens*. 1998;12(5):295-9.

Nishimura K, Li W, Hoshino Y, Kadohama T, Asada H, Ohgi S, Sumpio BE. Role of AKT in cyclic strain-induced endothelial cell proliferation and survival. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(3):C812-21.

Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 1992;258(5082):607-14.

Niwa K, Inanami O, Yamamori T, Ohta T, Hamasu T, Kuwabara M. Redox regulation of PI3K/Akt and p53 in bovine aortic endothelial cells exposed to hydrogen peroxide. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5(6):713-22.

O'Callaghan CJ, Williams B. The regulation of human vascular smooth muscle extracellular matrix protein production by alpha- and beta-adrenoceptor stimulation. *J Hypertens*. 2002;20(2):287-94.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-93.

Okamoto K, Yamamoto K, Morita N, Ohta Y, Chikugo T, Higashizawa T, Suzuki T. Establishment and use of the M strain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens Suppl.* 1986;4(3):S21-4.

Ormezzano O, Cracowski JL, Mallion JM, Poirier O, Bessard J, Briancon S, Francois P, Baguet JP. F2-Isoprostane level is associated with the angiotensin II type 1 receptor -153A/G gene polymorphism. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(5):583-8.

Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;19(3):415-20.

Park JB, Schiffrin EL. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *Am J Hypertens.* 2002a;15(2 Pt 1):164-9.

Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2002b;15(1 Pt 1):78-84.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-83.

Persson C, Kappert K, Engstrom U, Ostman A, Sjoblom T. An antibody-based method for monitoring in vivo oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Methods.* 2005;35(1):37-43.

Petkova SB, Ashton A, Bouzahzah B, Huang H, Pestell RG, Tanowitz HB. Cell cycle molecules and diseases of the cardiovascular system. *Front Biosci.* 2000; 5:D452-60.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1979;237(4):H461-8.

Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):77-88.

Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, Bonnet P, Rusch NJ. Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension.* 2002;40(2):214-9.

Puntarulo S, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(7-8):1324-30.

Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P, Mann K. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol.* 1995;15(7):3892-903.

Rao GN, Alexander RW, Runge MS. Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995;96(2):842-7.

Rao GN. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene.* 1996;13(4):713-9.

Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Roberts LJ 2nd, Morrow JD, Romero JC. Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2)-isoprostanes in rats. *Hypertension.* 2000;35(1 Pt 2):476-9.

Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284(4):R893-912.

Rey FE, Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(12):1962-71.

Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312(5782):1882-3.

Richard S. Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. *Drugs*. 2005;65 Suppl 2:1-10.

Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003;41(2):341-6.

Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP. Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999;42(7):819-25.

Romero JC, Strick DM. Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2(1):114-21.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000;86(12):1266-72.

Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, Byron KL, Samarel AM, Lucchesi PA. Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensin II in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1998;83(8):841-51.

Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(1):3-7.

Salazar FJ, Alberola A, Pinilla JM, Romero JC, Quesada T. Salt-induced increase in arterial pressure during nitric oxide synthesis inhibition. *Hypertension*. 1993;22(1):49-55.

Salmeen A, Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(5-6):560-77.

Sasaoka T, Wada T, Tsuneki H. Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. *Pharmacol Ther*. 2006;112(3):799-809.

Sayeski PP, Ali MS, Hawks K, Frank SJ, Bernstein KE. The angiotensin II-dependent association of Jak2 and c-Src requires the N-terminus of Jak2 and the SH2 domain of c-Src. *Circ Res*. 1999;84(11):1332-8.

Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(11):1191-212.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res*. 2000;87(12):1195-201.

Schiffirin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension*. 1992;19(2 Suppl):II1-9.

Schiffirin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101(14):1653-9.

Schiffirin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*. 2004;17(12 Pt 1):1192-200.

Schulman IH, Zachariah M, Raij L. Calcium channel blockers, endothelial dysfunction, and combination therapy. *Aging Clin Exp Res*. 2005;17(4 Suppl):40-5.

Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. Differential regulation of p27^{kip1} expression by mitogenic and hypertrophic factors: involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanism. *J Cell Biol.* 2000; 148:543–556.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91(5):406-13.

Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA.* 2003;290(22):2945-51.

Shen HM, Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(6):928-39.

Shimamoto K, Ura N. Mechanisms of insulin resistance in hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2006;28(6):543-52.

Shimizu S, Shiota K, Yamamoto S, Miyasaka Y, Ishii M, Watabe T, Nishida M, Mori Y, Yamamoto T, Kiuchi Y. Hydrogen peroxide stimulates tetrahydrobiopterin synthesis through the induction of GTP-cyclohydrolase I and increases nitric oxide synthase activity in vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(10):1343-52.

Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle.* 2006;5(5):512-8.

Somova LI, Channa ML, Khan MS. An experimental rat model of salt-sensitive hypertension; biochemical and morphological parameters and sympathetic nervous system. *J S Afr Vet Assoc.* 1999;70(1):14-7.

Somova LI, Nadar A, Gregory M, Khan N. Antioxidant status of the hypertrophic heart of Dahl hypertensive rat as a model for evaluation of antioxidants. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2001;23(1):5-12.

Song XM, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes*. 1999;48(3):664-70.

Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, Telemaque S, Pesic A, Rusch NJ. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. *Vascul Pharmacol*. 2006;44(3):131-42.

Sonoda Y, Watanabe S, Matsumoto Y, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem*. 1999;274(15):10566-70.

Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*. 1993;328(20):1444-9.

Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996;347(9004):781-6.

Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(11):2032-6.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401(6748):79-82.

Sullivan SG, Chiu DT, Errasfa M, Wang JM, Qi JS, Stern A. Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radic Biol Med*. 1994;16(3):399-403.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 1995;270(5234):296-9.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97(22):2222-9.

Taher MM, Mahgoub MA, Abd-Elfattah AS. Redox regulation of signal transduction in smooth muscle cells: distinct effects of PKC-down regulation and PKC inhibitors on oxidant induced MAP kinase. *J Recept Signal Transduct Res*. 1998;18(2-3):167-85.

Tanner FC, Greutert H, Barandier C, Frischknecht K, Luscher TF. Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension. *Hypertension*. 2003;42(2):184-8.

Terris JM, Berecek KH, Cohen EL, Stanley JC, Whitehouse WM Jr, Bohr DF. Deoxycorticosterone hypertension in the pig. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1976;3:303s-305s.

Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW. Cyclooxygenase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase MAPK, Rho kinase, and Src mediate hydrogen peroxide-induced contraction of rat thoracic aorta and vena cava. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(1):236-43.

Thurston H, Swales JD. Influence of sodium restriction upon two models of renal hypertension. *Clin Sci Mol Med*. 1976;51(3):275-9.

Thybo NK, Mulvany MJ, Jastrup B, Nielsen H, Aalkjaer C. Some pharmacological and elastic characteristics of isolated subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1996;14(8):993-8.

Tikkanen I, Omvik P, Jensen HA et coll. Comparison of the angiotensin II antagonist losartan with the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 1995;13:1343-1351.

Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*. 2001;2(3):222-8.

Tojo A, Onozato ML, Kobayashi N, Goto A, Matsuoka H, Fujita T. Angiotensin II and oxidative stress in Dahl Salt-sensitive rat with heart failure. *Hypertension*. 2002;40(6):834-9.

Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Griera M, Lopez-Ongil S, Arilla E, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol*. 2001;59(1):104-12.

Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999a;99(3):392-9.

Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*. 1999b;17(7):907-16.

Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*. 1999c; 17(7):907-16.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):639-72.

Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, Rajapurohitam V, Schiffrin EL. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 2001a;19(3):441-9.

Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension.* 2001b;38(1):56-64.

Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Schiffrin EL. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension.* 2001c;37(2 Part 2):574-80.

Touyz RM, Wu XH, He G, Salomon S, Schiffrin EL. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002a;39(2 Pt 2):479-85.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002b;90(11):1205-13.

Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003a;30(11):860-6.

Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003b;81(2):159-67.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004a;122(4):339-52.

Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 2004b;22(6):1141-9.

Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol.* 2005;90(4):449-55.

Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. *Diabetes.* 2001;50(8):1901-10.

Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, Lee WS, Yoshizumi M, Patterson C, Perrella MA, Cooke C, Wang H, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271(7):3667-70.

Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest.* 1999;104(7):925-35.

Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67(3):281-92.

Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res.* 2003;59(2):488-500.

Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW. Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem.* 1998a;273(31):19772-7.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 1998b;273(24):15022-9.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK. Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1999a;55(1):142-9.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1999b;274(32):22699-704.

Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):489-95.

Vallega GA, Canessa ML, Berk BC, Brock TA, Alexander RW. Vascular smooth muscle Na⁺-H⁺ exchanger kinetics and its activation by angiotensin II. *Am J Physiol.* 1988;254(6 Pt 1):C751-8.

Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):940-8.

Weber M. Clinical efficacy of eprosartan. *Pharmacotherapy.* 1999;19(4 pt2):95S-101S.

Weber MA. Comparison of type 1 angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *J Hypertens.* 1997;15(suppl.):S31-36.

Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens.* 1999;12(12 Pt 3):205S-213S.

Welch WJ, Mendonca M, Aslam S, Wilcox CS. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. *Hypertension.* 2003;41(3 Pt 2):692-6.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension.* 1997;29(4):1025-30.

Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4(2):160-6.

Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest.* 1996;97(2):508-14.

Yagil C, Hubner N, Kreutz R, Ganten D, Yagil Y. Congenic strains confirm the presence of salt-sensitivity QTLs on chromosome 1 in the Sabra rat model of hypertension. *Physiol Genomics.* 2003;12(2):85-95.

Yamori Y. Implication of hypertensive rat models for primordial nutritional prevention of cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(7):568-72.

Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR), the stroke-prone SHR (SHRSP) and their various substrain models for hypertension-related cardiovascular disease, in *Handbook of Hypertension Vol. 16 Experimental and Genetic Models of Hypertension* (Ganten D. and de Jong W., eds), 1994, pp. 346-364. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

Yang S, Hardaway M, Sun G, Ries WL, Key LL Jr. Superoxide generation and tyrosine kinase. *Biochem Cell Biol*. 2000;78(1):11-7.

Yang Z, Bove CM, French BA, Epstein FH, Berr SS, DiMaria JM, Gibson JJ, Carey RM, Kramer CM. Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106(1):106-11.

Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 2004;430(1):97-103.

Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000;342(3):154-60.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griending KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998;32(3):488-95.

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;35(5):1055-61.

Zhan CD, Sindhu RK, Vaziri ND. Up-regulation of kidney NAD(P)H oxidase and calcineurin in SHR: reversal by lifelong antioxidant supplementation. *Kidney Int.* 2004;65(1):219-27.

Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades RA. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(2):324-32.

Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5(4):416-23.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res.* 2002;91(11):1038-45.

Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 1):L897-902.

ANNEXE

Differential Calcium Regulation by Hydrogen Peroxide and Superoxide in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats

Fatiha Tabet, BSc, Carmine Savoia, MD, Ernesto L. Schiffrin, MD, PhD, and Rhian M. Touyz, MD, PhD

Abstract: We investigated the role of reactive oxygen species (ROS), particularly hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-) in the regulation of vascular smooth muscle cell (VSMC) Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and vascular contraction and assessed whether redox-dependent Ca^{2+} signaling and contraction are altered in hypertension. VSMCs and mesenteric arteries from Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were studied. Cells were stimulated with H_2O_2 (10^{-4} mol/l) or LY83583 (O_2^- generator, 10^{-5} mol/l). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and cytosolic O_2^- were measured by fura-2AM and tempo-9-AC fluorescence respectively. L-type and T-type Ca^{2+} channels were assessed using verapamil/diltiazem and mibefradil respectively and mRNA and protein expression of these channels was assessed by real-time PCR and immunoblotting respectively. H_2O_2 time-dependently increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contraction with significantly greater effects in SHR versus WKY ($P < 0.001$). LY83583 increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in both strains, but responses were blunted in SHR. Removal of extracellular Ca^{2+} abrogated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 and O_2^- . Verapamil and diltiazem, but not mibefradil, significantly decreased H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses with greater effects in SHR ($P < 0.01$). L-type and T-type Ca^{2+} channel inhibition reduced LY83583-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase only in WKY cells. Both types of Ca^{2+} channels were expressed (mRNA and protein) in VSMCs from WKY and SHR, with greater abundance in SHR than WKY (2- to 3-fold). These results demonstrate that ROS increase vascular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contraction, primarily via extracellular Ca^{2+} influx. Whereas responses to H_2O_2 are enhanced, O_2^- -mediated actions are blunted in SHR. These effects may relate to differential activation of Ca^{2+} channels by H_2O_2 and O_2^- . Enhanced activation of L-type Ca^{2+} channels and increased Ca^{2+} influx by H_2O_2 may contribute to increased Ca^{2+} signaling in VSMCs from SHR.

Key Words: vascular smooth muscle cells, calcium, hydrogen peroxide, superoxide anion, calcium channels

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2004;44:200–208)

Reactive oxygen species (ROS), particularly superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), have been suggested as mediators of vascular structural and functional changes in hypertension.^{1,2} Findings from in vitro and in vivo studies demonstrate that O_2^- and H_2O_2 increase vascular contractility, stimulate vascular smooth muscle cell (VSMC) growth, and induce inflammatory responses, characteristic features of small arteries in hypertension.^{1–5} ROS mediate these effects through redox-sensitive signaling pathways.^{6,7} In cultured VSMC and endothelial cells, ROS influence MAP kinases, tyrosine kinases, and transcription factors.^{8–10} In addition recent studies suggest that O_2^- and H_2O_2 modulate intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), a major determinant of contraction/relaxation in vascular smooth muscle.¹¹

In the vasculature, redox-sensitive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ effects have been demonstrated primarily in the endothelium. In isolated endothelial cells, increased generation of endogenous O_2^- by xanthine oxidase/hypoxanthine results in a rapid $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, followed by a slow and sustained elevation.¹² This biphasic response is due to Ca^{2+} mobilization from cytosolic stores followed by extracellular Ca^{2+} influx.¹² In bovine aortic endothelial cells, O_2^- inhibits Ca^{2+} release-activated entry (CRAC) and Ca^{2+} extrusion and accelerates Ca^{2+} leak from intracellular stores.¹³ O_2^- and H_2O_2 seem to differentially regulate endothelial $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Whereas O_2^- elicits a slow and sustained increase in endothelial $[\text{Ca}^{2+}]_i$, H_2O_2 induces concentration-dependent Ca^{2+} oscillations.¹⁴ Furthermore O_2^- increases bradykinin- and ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ¹⁵ while ONOO⁻ inhibits agonist-stimulated Ca^{2+} responses.¹⁶ Since endothelial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ plays an important role in nitric oxide regulation, these redox-sensitive processes may influence endothelium-dependent vasodilation. In fact, endogenous H_2O_2 has been suggested to be an endothelium-derived hyperpolarizing factor.¹⁷

Emerging evidence indicates that ROS also influence $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMCs.^{11,18,19} Most studies demonstrate an inhibi-

Received for publication September 9, 2003; accepted April 22, 2004.

From the CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension, Clinical Research Institute of Montreal, University of Montreal, Quebec, Canada.

This study was funded by Grant 57786 and a group grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Fatiha Tabet received a fellowship from the CIHR/Canadian Hypertension Society and from the Société Québécoise d'Hypertension Artérielle. Rhian M. Touyz received a scholarship from the CIHR/Canadian Hypertension Society.

Reprints: Rhian M. Touyz, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave. West, Montreal, H2W 1R7 Quebec, Canada (e-mail: [REDACTED])

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

tory effect of ROS on sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -transporting ATPase (SERCA), thereby decreasing Ca^{2+} transport into reticular stores resulting in cytosolic Ca^{2+} accumulation and increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$.^{18,20} Mechanisms whereby H_2O_2 inhibits SERCA are probably through oxidation of sulfhydryl groups or by direct attack on the ATP binding site.^{18,21} Superoxide stimulates IP_3 -induced Ca^{2+} release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum, further increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$.²² Ca^{2+} -activated Cl^- currents $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ are also regulated by redox-sensitive processes.²³ Diamide, a non-specific oxidant, enhanced the amplitude of $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ by stimulating Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels in smooth muscle cells from rabbit portal vein. Not all studies reported a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimulatory effect of ROS. In cultured aortic smooth muscle cells, O_2^- attenuates Ca^{2+} mobilization and decreases Ca^{2+} sensitivity of the contractile machinery.²⁴ Indeed, studies of ROS effects on vascular tone are contradictory. In most studies H_2O_2 and O_2^- induce vasoconstriction and attenuate endothelium-dependent vasodilation.^{20,25,26} However, in cerebral arterioles and in isolated coronary arteries H_2O_2 induces vasodilation^{27,28} and in isolated bovine aortic smooth muscle cells, O_2^- attenuates contraction.²⁴ Reasons for these conflicting results probably depend on the blood vessel studied, the concentration and type of free radical employed, and the presence or absence of vascular endothelium.

Few studies have examined the role of ROS in vascular Ca^{2+} homeostasis and contraction in hypertension. Gao and Lee²⁹ demonstrated that H_2O_2 -induced contractile responses are enhanced in isolated mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats (SHR) compared with normotensive Wistar Kyoto (WKY) controls. Rodriguez-Martinez et al³⁰ reported that H_2O_2 -induced contraction is augmented in de-endothelialized aorta from SHR. However, the role of VSMC Ca^{2+} in these processes is unclear. To address this we investigated whether H_2O_2 and O_2^- modulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMCs from WKY and SHR and assessed whether $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to ROS are differentially regulated in hypertension. Furthermore we studied putative mechanisms whereby ROS influence $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by examining the role of Ca^{2+} channel-mediated Ca^{2+} influx.

METHODS

Animals

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Clinical Research Institute of Montreal (IRCM). Male WKY and SHR (Taconic Farms Inc, Germantown, NY) were used. Rats were killed by decapitation.

Cell Culture

Vascular smooth muscle cells derived from mesenteric arteries were isolated from 10 WKY and 10 SHR rats and characterized as described previously.³¹ Briefly, mesenteric arteries were cleaned of adipose and connective tissue and VSMCs

dissociated by enzymatic digestion. The tissue was filtered and the cell suspension centrifuged and resuspended in DMEM containing heat-inactivated calf serum, HEPES, L-glutamine, penicillin, and streptomycin. VSMCs were grown on round glass coverslips (25 mm diameter) in plastic dishes and maintained at 37°C in a humidified incubator (5% CO_2 /95% air). Low-passaged cells (passages 3 to 6) were used. Before experimentation, cells were rendered quiescent by serum deprivation and maintenance in serum-free DMEM for 24 hours.

Measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured using the fluorescent probe fura-2AM (Molecular Probes, OR) as previously described.³¹ On the day of the study, the culture medium was replaced with warmed modified Hanks buffered saline containing (mmol/l): 137 NaCl, 4.2 NaHCO_3 , 3 Na_2HPO_4 , 5.4 KCl, 0.4 KH_2PO_4 , 1.3 CaCl_2 , 0.5 MgCl_2 , 10 glucose, 0.8 MgSO_4 and 5 HEPES (pH 7.4). Cells were loaded with fura-2AM (4 $\mu\text{mol/l}$), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) containing 0.02% pluronic F-127 (Molecular Probes), and incubated for 30 minutes at 37°C in a humidified incubator. Under these loading conditions, the ratiometric fluorescence cell images are homogeneous, indicating no significant compartmentalization of the dye. After 30 minutes, the loaded cells were washed and used after a 5- to 10-minute stabilization period. All washing procedures and experiments were performed at room temperature, thereby minimizing compartmentalization and cell extrusion of the dye. The coverslip containing cells was placed in a stainless steel chamber and mounted on the stage of an inverted microscope ($\times 40$ -oil immersion objective), and an Attofluor fluorescence digital imaging system (Zeiss) was used, as previously described.³¹ Fura-2AM loaded cells were exposed to an excitation wavelength of 340 and 380 nm while monitoring the emission signal at 510 nm.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses were measured in cells exposed to increasing concentrations of H_2O_2 and LY83583, a superoxide-generating naphthoquinolinedione³² in the absence (2 mmol/L EGTA) or presence of extracellular Ca^{2+} . To determine whether H_2O_2 or LY83583-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes were dependent on Ca^{2+} influx through L or T-type calcium channels, L-type (verapamil and diltiazem) and T-type (mibefradil) Ca^{2+} channel inhibitors were used. In these experiments, cells were pretreated for 15 to 20 minutes with vehicle, verapamil (10^{-5} mol/L), diltiazem (10^{-5} mol/L), or mibefradil (10^{-5} mol/L) before H_2O_2 (0 to 90 minutes) or LY83583 (0 to 75 minutes) stimulation. To determine whether H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes were reversible after 75 minutes of stimulation, VSMCs were washed with Hanks buffer during 20 minutes and the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were measured.

Measurement of O_2^- Production

To determine whether LY83583 does in fact stimulate O_2^- generation in our experimental model, cells were exposed

to LY83583 (0 to 75 minutes) and the fluorescence intensity was measured using the probe Tempo-9-AC.³³ Cells were loaded with the fluoroprobe (4 $\mu\text{mol/L}$) for 30 minutes at room temperature and washed 3 times with Hanks modified buffer. Loaded cells were allowed to equilibrate for 5 to 10 minutes before analysis. In some experiments, cells were pre-exposed to tempol (1 mmol/L, for 20 minutes), a superoxide anion scavenger, and then subjected to LY83583 stimulation. Fluorescence was measured using an Attofluor system (Zeiss) as we described.³³ Excitation and emission wavelengths were set at 360 nm and 510 nm respectively.

Vascular Smooth Muscle α_{1C} and α_{1G} Subunits mRNA Levels

Cellular mRNA levels of α_{1C} (L-type Ca^{2+} channels) and α_{1G} subunits (T-type Ca^{2+} channel) were studied by real-time PCR. Total RNA was isolated from WKY and SHR VSMCs by using Trizol Reagent (GIBCO-BRL). Reverse transcription was performed using 2 μg of RNA as previously described.³⁴ Real-time PCR was performed with a Stratagene Mx4000 System for relative quantification of VSMCs α_{1C} and α_{1G} subunits mRNA. Sense and antisense primers were designed to generate short amplification products (82 bp for α_{1C} subunit, 239 bp for α_{1G} subunit, and 107 bp for ribosomal protein S16, used as an internal standard), which spanned one intron region to detect contamination by genomic DNA. Primers for VSMCs α_{1C} subunit were: sense 5'-CCTCATTGGCTCAGAGAAGT-3' and antisense 5'-TACATCTTCAGGAGCATTCT-3'; for VSMCs α_{1G} subunit: sense 5'-GCTGGAATGTGCTGGACGGCTTG-3' and antisense 5'-ATGAAGAAGGCACAG CAAATGACC -3'; and for S16: sense 5'-AGGAGCGATTGCTGGTGTGG-3', and antisense 5'-GCTACCAGGGCCTTTGAGATG-3'. To validate our real-time PCR protocol, gene-specific standard curves for VSMCs α_{1C} , α_{1G} subunits, and S16 were generated from serial dilutions of the cDNA. Using the Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) and a final 0.5 $\mu\text{mol/L}$ concentration of primers, real-time PCR was conducted with an initial denaturing interval (95°C, 15 minutes) and then 40 sequence cycles: 94°C (30 seconds), 56°C (45 seconds), and 72°C (30 seconds). A melting curve analysis was also performed to check absence of formation of primer-dimers. All samples were run in duplicate. Samples from WKY cDNAs were used as calibrators and variations of α_{1C} and α_{1G} subunits from SHR VSMCs were calculated as a relative quantity compared with WKY group. Results are expressed as the ratio between the gene of interest and S16 relative quantities.

Western Blot Analysis

Vascular smooth muscle cells from WKY and SHR, passages 3 to 6, were washed twice with cold PBS. Lysis buffer (Na pyrophosphate 50 mmol/L, NaF 50 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, Na_3VO_4 2

mmol/L, HEPES pH 7.4, 10 mmol/L, Triton X-100 0.1%, PMSF 50 mmol/L, pepstatin 1 $\mu\text{g/ml}$, leupeptin 1 $\mu\text{g/ml}$, aprotinin 1 $\mu\text{g/ml}$) was added and the plates were placed on dry ice for 5 minutes. Cells were scraped off, transferred to Eppendorf tubes, and sonicated for 5 seconds. The protein supernatant was separated by centrifugation and protein concentrations were determined with the Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); 30 μg of proteins were loaded on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (Boehinger, Mannheim, Laval, Quebec, Canada) for 2h30 at 100 V. Membranes were blocked with blocking buffer, containing 5% w/v non-fat dry milk in PBS and incubated overnight at 4°C. Membranes were incubated for 2 hours with anti- α_{1C} subunit antibody (1:1000) (Chemicon International), recognizing L-type Ca^{2+} channels. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence and blots analyzed densitometrically (Image-Quant Software, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Preparation and Study of Small Arteries

Sixteen-week-old WKY and SHR rats were killed by decapitation and the third-order superior mesenteric artery (≈ 2 mm in length) was isolated and mounted on 2 glass microcannulae in a pressurized myograph under constant intraluminal pressure (45 mm Hg).³⁵ The vessels were equilibrated with warm (37°C) physiological salt solution (in mmol/L: NaCl 120, NaHCO_3 25, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, MgSO_4 1.18, CaCl_2 2.5, EDTA 0.026, and glucose 5.5) and bubbled continuously with 95% air and 5% CO_2 to achieve a pH of 7.4. Vessels were used if they constricted ($> 50\%$) in response to potassium (125 mmol/L KCl) with norepinephrine (10^{-5} mol/L).

Contraction to H_2O_2 (10^{-4} mol/l) was assessed in a time-dependent manner and was expressed as a percentage of maximal response.

Statistical Analysis

Results are presented as the mean \pm SEM and compared by 2-way ANOVA with repeated measures followed by a Bonferroni post-test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Effect of H_2O_2 and LY83583 on Vascular Smooth Muscle Cells [Ca^{2+}]_i

At low concentrations, H_2O_2 - and LY83583-induced [Ca^{2+}]_i effects were modest. Nevertheless H_2O_2 and LY83583 dose-dependently increased [Ca^{2+}]_i, with significant responses observed at 10^{-4} mol/L and 10^{-5} mol/L respectively (Fig. 1). Subsequent studies were performed using these concentrations. To ensure that cells were viable following H_2O_2 stimulation, an additional set of experiments was performed where [Ca^{2+}]_i was determined in H_2O_2 -stimulated cells following a washout period (20 minutes). As demonstrated in Figure 2,

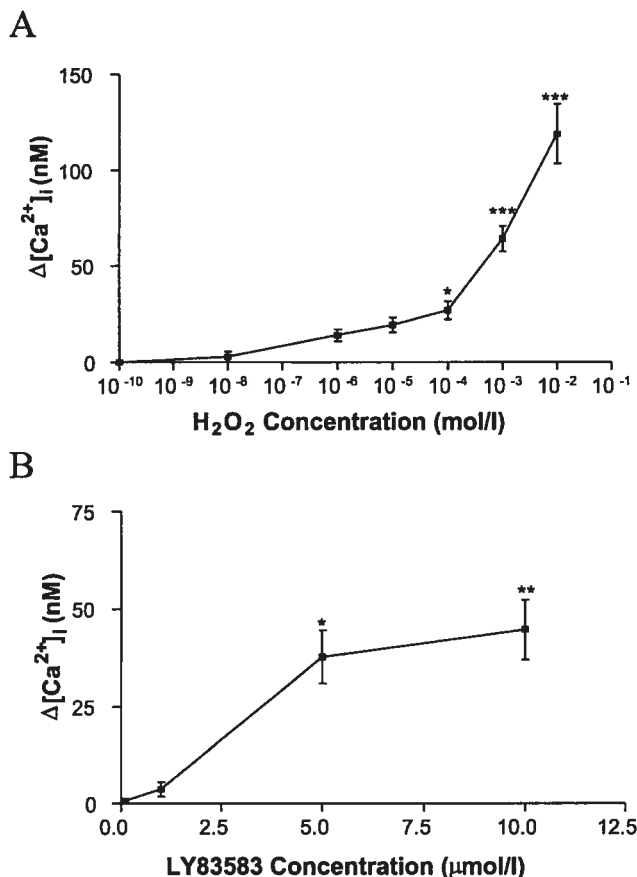


FIGURE 1. Line graphs demonstrate effects of increasing concentrations of H_2O_2 (A) and LY83583 (B) on $[Ca^{2+}]_i$ responses in VSMCs from WKY rats. Responses were measured after 15 minutes of incubation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus basal values.

following the washout phase, $[Ca^{2+}]_i$ returned to pre-stimulated levels.

Effect of H_2O_2 on Vascular Smooth Muscle Cells $[Ca^{2+}]_i$ in the Absence and Presence of Extracellular Ca^{2+}

In the presence of extracellular Ca^{2+} , H_2O_2 induced a significant increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3). Responses were slow in both WKY and SHR and were significantly increased above basal levels after 30 minutes; 75 minutes after stimulation, $[Ca^{2+}]_i$ was increased more than 3-fold in SHR, which was significantly greater than responses in WKY ($P < 0.001$). In the absence of extracellular Ca^{2+} , H_2O_2 -mediated $[Ca^{2+}]_i$ effects were abrogated in both groups.

Effect of L-type and T-type Calcium Channel Inhibitors on H_2O_2 Induced $[Ca^{2+}]_i$ Increase

Removal of extracellular Ca^{2+} abolished H_2O_2 -mediated actions, suggesting that $[Ca^{2+}]_i$ responses are due to extracel-

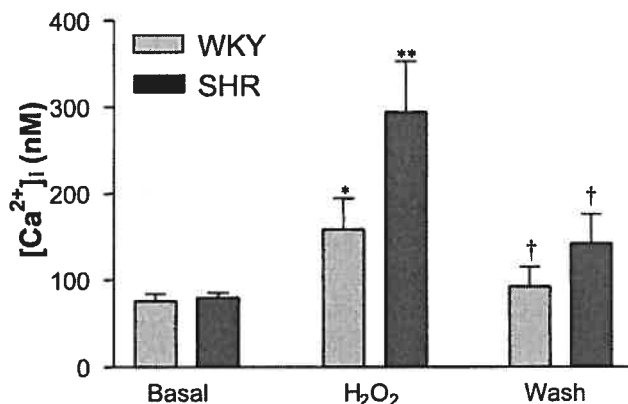


FIGURE 2. Bar graph indicates $[Ca^{2+}]_i$ responses before (basal) and after (wash) H_2O_2 (10^{-4} mol/L, 75 minutes) stimulation in VSMCs from WKY and SHR. Responses were measured after 20 minutes of washing with Hanks buffer. Results are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus counterpart control. † $P < 0.05$ versus H_2O_2 treatment.

lular Ca^{2+} influx (Fig. 3). To investigate whether Ca^{2+} channels play a role in this process, cells were pretreated with 2 different types of L-type Ca^{2+} channel blockers, verapamil and diltiazem. In addition, T-type Ca^{2+} channels were investigated using the T-type blocker, mibefradil. As shown in Figures 4A and 4B, both verapamil and diltiazem decreased H_2O_2 -mediated $[Ca^{2+}]_i$ transients, with significantly greater effects in SHR. Pre-exposure of cells to mibefradil did not produce

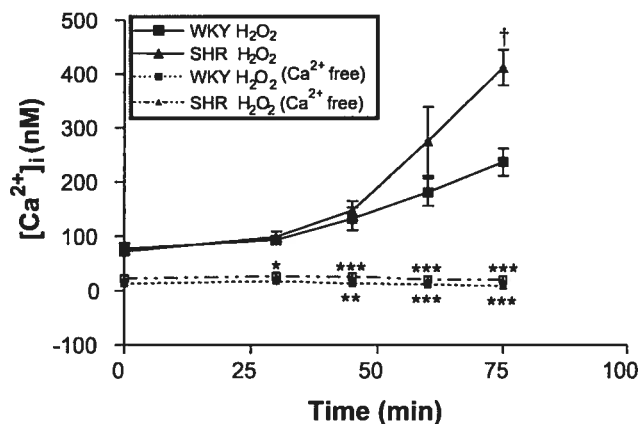


FIGURE 3. Line graphs demonstrate effects of H_2O_2 (10^{-4} mol/L) on $[Ca^{2+}]_i$ in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} (as described in the method). Cells were pre-incubated in a Ca^{2+} free buffer for 15 minutes prior to addition of H_2O_2 . Results are presented as the H_2O_2 -induced change in $[Ca^{2+}]_i$ measured using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10 to 20 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus H_2O_2 counterpart. † $P < 0.001$ versus WKY group.

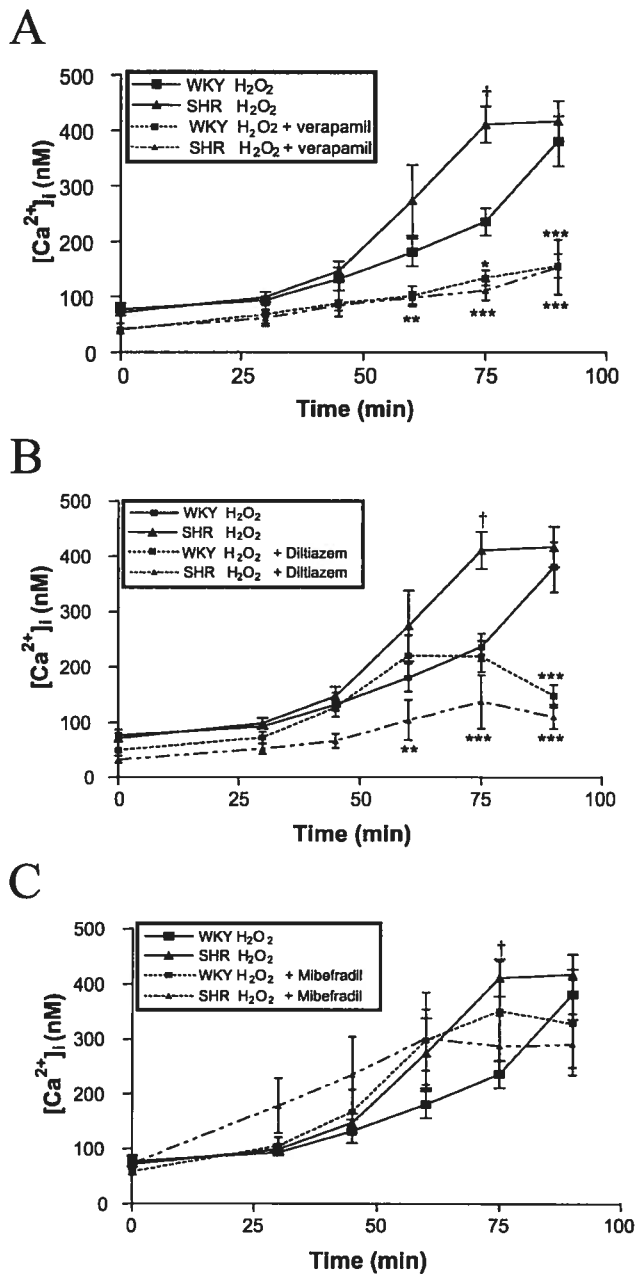


FIGURE 4. (A) Representative tracings of $[Ca^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 (10^{-4} mol/L) in the presence or absence of verapamil (10^{-5} mol/L). (B) Representative tracings of $[Ca^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 in the presence or absence of diltiazem (10^{-5} mol/L). (C) Representative tracings of $[Ca^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 in the presence or absence of mibefradil (10^{-5} mol/L). VSMCs were pretreated for 15 to 20 minutes with vehicle, verapamil, diltiazem, or mibefradil before H_2O_2 (0 to 90 minutes) stimulation. Results are presented as the H_2O_2 -induced change in $[Ca^{2+}]_i$ measures using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10 to 20 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus H_2O_2 counterpart. † $P < 0.001$ versus WKY group.

any significant change in H_2O_2 -induced $[Ca^{2+}]_i$ responses (Fig. 4C).

$[Ca^{2+}]_i$ Effect of LY83583 in the Presence and Absence of Extracellular Ca^{2+}

To evaluate whether intracellular O_2^- influences $[Ca^{2+}]_i$, VSMCs were exposed to LY83583, a cell membrane-permeable naphthoquinolinedione, which generates O_2^- .³² To verify that LY83583 does in fact induce O_2^- formation in VSMCs, we measured cytosolic O_2^- levels using Tempo-9AC.³³ As demonstrated in Figure 5, LY83583 stimulation resulted in a slow and sustained increase in Tempo-9AC fluorescence both in WKY and SHR cells (~2-fold). To confirm that this increase was due to intracellular increase in O_2^- , cells were pre-exposed to tempol, a superoxide dismutase (SOD) mimetic, which significantly attenuated LY83583-induced fluorescence.

LY83583 induced a time-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ in both WKY and SHR cells (Fig. 6). Maximal responses were obtained within 45 minutes and were significantly blunted in SHR compared with WKY cells ($P < 0.05$). Removal of extracellular Ca^{2+} abolished LY83583-elicited $[Ca^{2+}]_i$ responses.

Effect of L-Type and T-Type Calcium Channel Inhibitors on LY83583-Induced $[Ca^{2+}]_i$ Responses

As demonstrated in Figures 7A and 7B, verapamil and diltiazem significantly decreased ($P < 0.05$) LY83583-induced $[Ca^{2+}]_i$ signals in WKY ($P < 0.05$), but not in SHR cells. Mibefradil also significantly reduced LY83583 effects in

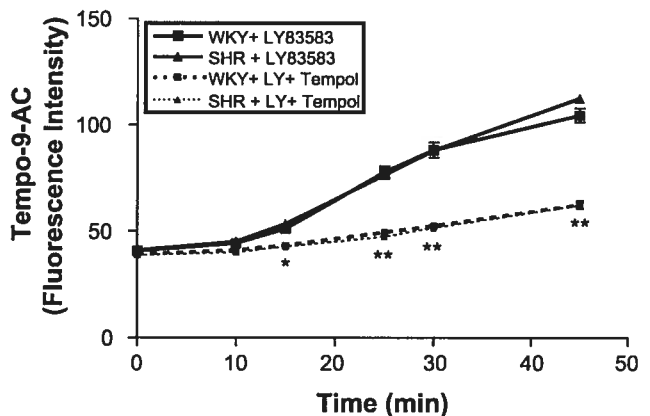


FIGURE 5. Line graphs demonstrate effects of LY83583 (10 μ mol/L) on Tempo-9-AC fluorescence in the absence and presence of tempol (1 mmol/l) (as described in the method). Cells were pretreated with tempol for 20 minutes prior to LY83583 stimulation. Results are presented as the LY83583-induced change in Tempo-9-AC fluorescence. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10 to 20 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ versus LY83583 counterpart.

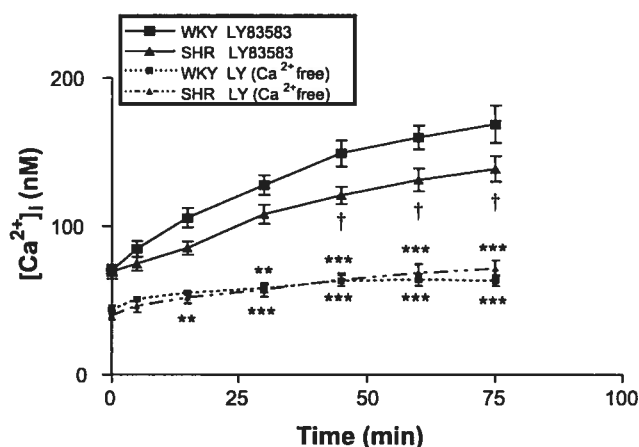


FIGURE 6. Line graphs demonstrate effects of LY83583 (10 $\mu\text{mol/L}$) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} . Cells were pre-incubated in a Ca^{2+} free buffer for 15 minutes prior to addition of H_2O_2 . Results are presented as the LY83583-induced change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10 to 20 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus LY83583 counterpart. † $P < 0.05$ versus WKY group.

WKY only ($P < 0.001$) (Fig. 7C). Although Ca^{2+} channel blockers decreased LY83583-induced actions in WKY, responses were not completely inhibited.

Vascular Smooth Muscle Cells α_{1C} and α_{1G} Subunits mRNA and Protein Content

Relative quantification of α_{1C} and α_{1G} subunits mRNA content in VSMCs from WKY and SHR by real-time PCR showed a 2.5-fold increase in mRNA levels of α_{1C} subunit in SHR VSMCs as compared with WKY ($P < 0.05$). Similar result was observed with the α_{1G} subunit mRNA contents (~3-fold increase in SHR as compared with WKY VSMCs, $P < 0.01$) (Fig. 8A). In addition to increased mRNA expression, protein content of L-type Ca^{2+} channel was enhanced in VSMCs from SHR (Fig. 8B).

Functional Effect of H_2O_2

To evaluate whether ROS influence Ca^{2+} -dependent function, we assessed vascular contractile responses to H_2O_2 . H_2O_2 induced significant contraction, which was time dependent (Fig. 9). Contractile responses were significantly higher in mesenteric vessels from SHR compared with WKY ($27.6 \pm 4.2\%$ of contraction in SHR versus $12 \pm 3.3\%$ of contraction in WKY) (Fig. 9).

DISCUSSION

Despite the fact that ROS have been implicated to play a role in Ca^{2+} signaling, there is a paucity of information regard-

ing ROS effects on Ca^{2+} homeostasis in VSMCs, and to our knowledge, there are no detailed studies comparing redox-sensitive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses in VSMCs from normotensive and hypertensive rats. Here we demonstrate that H_2O_2 and $\cdot\text{O}_2^-$ increase vascular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contractile responses in WKY and SHR. These effects are dependent on extracellular Ca^{2+} and are mediated primarily via influx through Ca^{2+} channels, which appear to be up-regulated in SHR. Of particular interest, whereas H_2O_2 -mediated effects are increased, LY83583-mediated actions are blunted in SHR compared with WKY. Our data suggest that H_2O_2 may be more important than $\cdot\text{O}_2^-$ in enhanced vascular Ca^{2+} signaling and contraction in SHR and may be attributable, at least in part, to increased VSMC Ca^{2+} channel activation.

Similar to our findings, others reported that H_2O_2 increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in vascular cells.^{11,19,26,36} However, whereas previous studies showed that H_2O_2 regulates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by altering inositol 1,4,5 trisphosphate (IP_3) and SERCA activity,^{18,21,22,37} we found that H_2O_2 increases Ca^{2+} mainly by stimulating extracellular Ca^{2+} influx. This was evidenced by findings that depletion of extracellular Ca^{2+} abolished H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in both WKY and SHR cells. These responses appear to be mediated via L-type, rather than through T-type Ca^{2+} channels, since verapamil and diltiazem, selective L-type Ca^{2+} channel blockers, but not mibefradil, specific T-type Ca^{2+} channel blocker, reduced H_2O_2 effects. Exact mechanisms whereby ROS influence Ca^{2+} channels are unclear but altered redox state of SH-groups may be important.³⁸ Most studies examining effects of ROS on Ca^{2+} channels were performed in cardiac cells, where a direct correlation between H_2O_2 levels and L-type Ca^{2+} channel activation was found.³⁹ However, not all studies reported stimulatory effects of ROS. In mouse cerebral cortical neurons, hydroxyl ion suppressed Ca^{2+} influx through L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels.⁴⁰ These differential responses may relate to cell-type specificity. Neither verapamil nor diltiazem completely blocked H_2O_2 -mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ effects in VSMCs, indicating that mechanisms other than Ca^{2+} channels contribute to Ca^{2+} influx. It is possible that sodium-calcium exchangers (NCX), non-specific ion channels, and the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) may play a role, since these transporters are also regulated by H_2O_2 .

The magnitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhibition by verapamil and diltiazem was greater in SHR than WKY cells, suggesting that H_2O_2 -induced effects on L-type Ca^{2+} channels are enhanced in SHR. This is supported by our findings that Ca^{2+} channel expression, both at the mRNA and protein levels, was augmented in SHR compared with WKY. This may contribute to the augmented $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response by H_2O_2 in SHR and may explain why H_2O_2 -induced contractile responses are exaggerated in SHR.^{29,30} In fact increased VSMC Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels has been reported in hypertension. In mesenter-

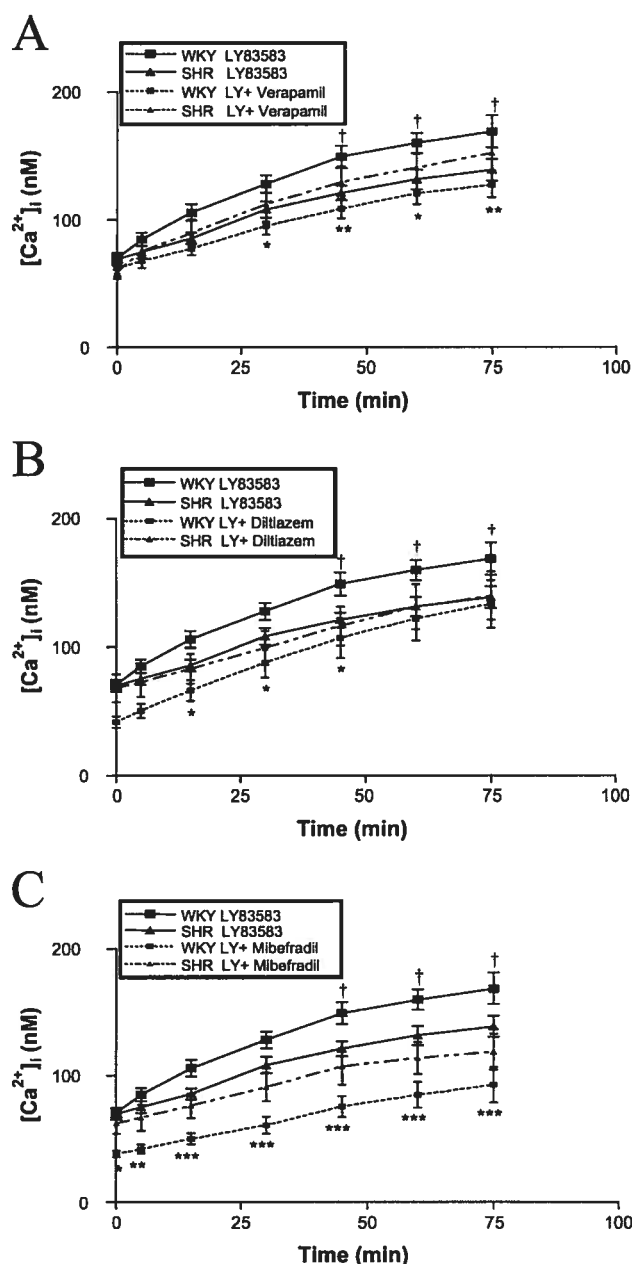


FIGURE 7. (A) Line graphs demonstrate effects of LY83583 (10 $\mu\text{mol/L}$) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of verapamil (10^{-5} mol/L). (B) Line graphs demonstrate effects of LY83583 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of diltiazem (10^{-5} mol/L). (C) Line graphs demonstrate effects of LY83583 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the absence and presence of mibefradil (10^{-5} mol/L). VSMCs were pretreated for 15 to 20 minutes with vehicle, verapamil, diltiazem, or mibefradil before LY83583 (0 to 75 minutes) stimulation. Results are presented as the LY83583-induced change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measures using the fluorescent probe Fura-2AM. Values are expressed as means \pm SEM, with each data point comprising from 10 to 20 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus H_2O_2 counterpart. † $P < 0.05$ versus SHR group.

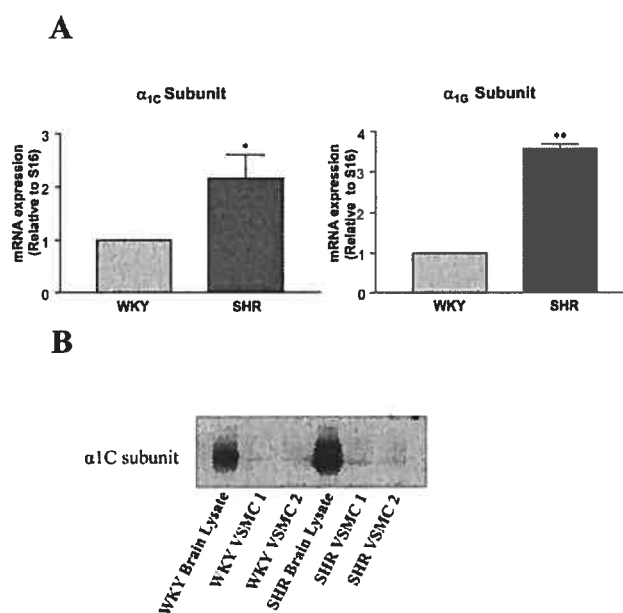


FIGURE 8. (A) Bar graphs indicate relative quantification of α_{1C} (L-type Ca^{2+} channel) and α_{1G} subunits (T-type Ca^{2+} channel) mRNA content in VSMCs from WKY and SHR. Results are expressed as the ratio between the gene of interest and the gene of ribosomal protein S16 relative quantities. Results are presented as mean \pm SEM for $n = 6$. (B) Representative immunoblot demonstrate protein content of α_{1C} subunits in VSMCs from WKY and SHR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus WKY.

ic VSMCs from SHR membrane density of whole-cell and single-channel L-type Ca^{2+} currents is increased and L-type Ca^{2+} currents are larger compared with WKY rats.^{42,43} Pratt et al⁴⁴ described a potential mechanism for this increase. They showed that the α_{1C} subunit mRNA and pore-forming protein are up-regulated in SHR mesenteric and skeletal arteries and that the increased number of L-type Ca^{2+} channel pores are associated with the generation of abnormal tone.⁴⁴

Compared with H_2O_2 , LY83583-mediated actions were modest. In fact maximal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to H_2O_2 were increased 3- to 4-fold, whereas responses were only increased approximately 1.5-fold by LY83583. In WKY cells, verapamil, diltiazem, and mibefradil attenuated LY83583-induced effects, suggesting that O_2^- regulates Ca^{2+} influx, at least in part, through activation of L- and T-type Ca^{2+} channels. These O_2^- -dependent processes do not seem to be important in SHR, since Ca^{2+} channel inhibitors had no effect on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses, which were in fact blunted. These findings indicate differential regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by O_2^- in WKY and SHR. Reasons underlying reduced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responsiveness to O_2^- are unclear, but may relate to Ca^{2+} channel insensitivity by O_2^- in SHR. Some studies reported that ROS inhibit Ca^{2+} channel activity and Ca^{2+} influx, which could also contribute to reduced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ effects.^{20,39}

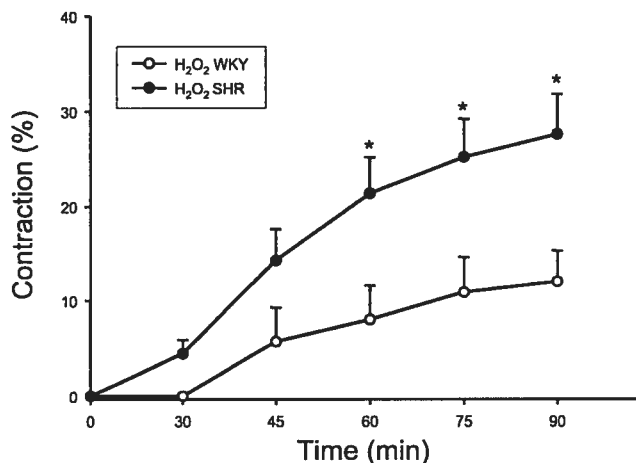


FIGURE 9. Line graph demonstrates the time-dependent response of WKY and SHR mesenteric resistance arteries to H_2O_2 (10^{-4} mol/L) stimulation. Results are presented as a percentage of contraction as compared with the basal state and are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$. * $P < 0.05$ versus WKY.

The apparent paradoxical finding that H_2O_2 increases Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channels in SHR, whereas O_2^- does not seem to influence Ca^{2+} channel activity in SHR, even though it regulates Ca^{2+} influx via Ca^{2+} channels in WKY, highlights the complexity of processes whereby ROS mediate intracellular events. As we previously suggested⁴⁵ the specific type of species generated, the intracellular compartment in which H_2O_2 and O_2^- localize, the kinetics of ROS generation, and the mechanisms of cellular ROS regulation probably contribute to differential ROS actions. It could be speculated that in SHR VSMCs, H_2O_2 , which has a long half life and is a stable ROS, may be in close association with Ca^{2+} channels, whereas O_2^- , which is less stable, and that appears to be more rapidly metabolized in SHR than in WKY cells as reflected by the lower intracellular levels, may not. Previous studies have also demonstrated paradoxical actions of ROS in VSMCs.^{46–48} In fact, ROS have been described to have dual vasoconstriction/vasodilation properties.⁴⁵

The functional significance of ROS-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulation relates to our findings that H_2O_2 influenced vascular contraction and that responses were enhanced in SHR. These results confirm those of Gao and Lee²⁹ who showed that H_2O_2 induces an exaggerated contraction in mesenteric arteries of SHR through thromboxane A2 production. However, not all studies demonstrated vasoconstriction in response to ROS. Endothelium-dependent H_2O_2 -induced vasorelaxation has been demonstrated in human coronary and mesenteric arteries, cat cerebral arterioles, piglet pial arterioles, mouse mesenteric arteries, and rat cerebral arteries.^{49–51} Reasons for these differences may relate to vessel heterogeneity and/or to the free radical species studied.

In summary, our study demonstrates the novel findings that H_2O_2 and O_2^- differentially regulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMCs from SHR. Whereas H_2O_2 -induced effects are enhanced, O_2^- actions are blunted. Mechanisms underlying these processes may relate to increased activation of L-type Ca^{2+} channel by H_2O_2 , but not by O_2^- . Furthermore, since H_2O_2 effects were significantly greater than those of O_2^- , we propose that H_2O_2 may be a more important ROS signaling molecule than O_2^- in VSMCs, as has been previously suggested.^{8–10} An aspect of our study that should be considered relates to the concentration of H_2O_2 used. Although 10^{-4} mol/L is not a physiological concentration, under pathologic conditions, such as in ischemia-reperfusion injury and in vascular damage associated with hypertension, diabetes, and atherosclerosis, vascular H_2O_2 can increase to levels within the μM range.^{20,52,53} Thus data from our study identify a redox-sensitive Ca^{2+} process that may play an important role in altered vascular function in hypertension.

REFERENCES

1. Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2000;2:98–105.
2. Schiffrin EL, Touyz RM. Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: Role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:707–709.
3. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H_2O_2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998;32:488–495.
4. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, et al. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:10045–10048.
5. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, et al. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 1997;95:588–593.
6. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L1005–L1028.
7. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47–95.
8. Griending KK, Sorescu D, Lassegue B, et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2175–2183.
9. Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, et al. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:159–167.
10. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:940–948.
11. Roveri A, Coassin M, Maiorino M, et al. Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 1992;297:265–270.
12. Dreher D, Jornot L, Junod AF. Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca^{2+} stores and protein synthesis in human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76:388–395.
13. Kimura C, Oike M, Ito Y. Acute glucose overload abolishes Ca^{2+} oscillation in cultured endothelial cells from bovine aorta: a possible role of superoxide anion. *Circ Res.* 1998;82:677–685.
14. Hu Q, Corda S, Zweier JL, et al. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1998;97:268–275.

15. Graier WF, Hoebel BG, Paltauf-Doburzynska J, et al. Effects of superoxide anions on endothelial Ca^{2+} signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1470–1479.
16. Elliott SJ. Peroxynitrite modulates receptor-activated Ca^{2+} signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996;270:L954–L961.
17. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci.* 2003;92:1–6.
18. Grover AK, Samson SE, Robinson S, et al. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C294–C301.
19. Krippeit-Drews P, Haberland C, Fingerle J, et al. Effects of H_2O_2 on membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ of cultured rat arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209:139–145.
20. Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1362–1369.
21. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca^{2+} -ATPase. *Arch Biochem Biophys.* 1986;246:589–601.
22. Suzuki YJ, Ford GD. Superoxide stimulates IP_3 -induced Ca^{2+} release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1992;262:H114–H116.
23. Greenwood IA, Leblanc N, Gordienko DV, et al. Modulation of $ICl(Ca)$ in vascular smooth muscle cells by oxidizing and cysteine-reactive reagents. *Pflügers Arch.* 2002;443:473–482.
24. Kimura C, Cheng W, Hisadome K, et al. Superoxide anion impairs contractility in cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H382–H390.
25. Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med.* 1988;4:107–120.
26. Yang ZW, Zheng T, Wang J, et al. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;360:646–653.
27. Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol.* 1996;271:H1262–H1266.
28. Barlow RS, White RE. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol.* 1998;275:H1283–H1289.
29. Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane $A(2)$ production. *Br J Pharmacol.* 2001;134:1639–1646.
30. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, et al. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol.* 1998;125:1329–1335.
31. Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Mesenteric vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats display increased calcium responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens.* 1994;12:663–673.
32. Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H_2O_2 and O_2^- in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;77:29–36.
33. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:981–987.
34. Touyz RM, Endemann D, He G, et al. Role of AT_2 receptors in Ang II-stimulated contraction of small arteries in young SHR. *Hypertension.* 1999;33:366–373.
35. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, et al. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation.* 2002;105:2296–2302.
36. Schachter M, Gallagher KL, Patel MK, et al. Oxidants and vascular smooth muscle. *Biochem Soc Trans.* 1989;17:1096–1097.
37. Elmoselhi AB, Samson SE, Grover AK. SR Ca^{2+} pump heterogeneity in coronary artery: free radicals and IP_3 -sensitive and -insensitive pools. *Am J Physiol.* 1996;271:C1652–C1659.
38. Az-ma T, Saeki N, Yuge O. Cytosolic Ca^{2+} movements of endothelial cells exposed to reactive oxygen intermediates: role of hydroxyl radical-mediated redox alteration of cell-membrane Ca^{2+} channels. *Br J Pharmacol.* 1999;126:1462–1470.
39. Thomas GP, Sims SM, Cook MA, et al. Hydrogen peroxide-induced stimulation of L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes and its inhibition by adenosine A1 receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286:1208–1214.
40. Shirotani K, Katsura M, Higo A, et al. Suppression of Ca^{2+} influx through L-type voltage-dependent calcium channels by hydroxyl radical in mouse cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;92:12–18.
41. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, et al. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem.* 2002;277:23150–23156.
42. Ohya Y, Abe I, Fujii K, et al. Voltage-dependent Ca^{2+} channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1993;73:1090–1099.
43. Ohya Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, et al. Single L-type calcium channels in smooth muscle cells from resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;31:1125–1129.
44. Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, et al. Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension.* 2002;40:214–219.
45. Touyz RM. Activated oxygen metabolites: do they really play a role in angiotensin II-regulated vascular tone? *J Hypertens.* 2003;21:2235–2238.
46. Griendling KK, Harrison DG. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res.* 1999;85:562–563.
47. Weber DS, Griendling KK. The yin/yang of superoxide dismutase mimetics: potential cardiovascular therapies? *Br J Pharmacol.* 2003;139:1059–1060.
48. Schuijt MP, Tom B, De Vries R, et al. Superoxide does not mediate the acute vasoconstrictor effects of angiotensin II: a study in human and porcine arteries. *J Hypertens.* 2003;21:2335–2344.
49. Matoba T, Shimokawa H. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci.* 2003;92:1–6.
50. Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, et al. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1224–1230.
51. Lacza Z, Puskar M, Kis B, et al. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H406–H411.
52. Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, et al. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol.* 1997;272:L897–L902.
53. Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, et al. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem.* 1994;269:24156–24162.

the intracellular thiol/disulfide redox state [6,14,15]. Although MAP kinases are regulated by oxygen free radicals, they are probably not direct substrates of $^{\circ}\text{O}_2^-$ and H_2O_2 .

The exact mechanisms whereby ROS influence MAP kinase activity remain unclear. However, the activation of tyrosine kinases and protein kinase C (PKC) may be important, because these molecules are redox-sensitive and are upstream of MAP kinases [8]. Receptor tyrosine kinases (RTK), such as platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), epidermal growth factor receptor (EGFR) and insulin-like growth factor receptor (IGFR), non-receptor tyrosine kinases (NRTK), such as JAK2 and Src, and various isoforms of PKC have been demonstrated to be targets of ROS [16–19].

In the present study we questioned the role of tyrosine kinases and PKC in the activation of ERK1/2 and p38MAP kinase by H_2O_2 in VSMC. In addition, we sought to evaluate whether redox-sensitive activation of these MAP kinases, important in growth and pro-inflammatory signaling in VSMC, is differentially regulated in cells from spontaneously hypertensive rats (SHR). Of the many ROS, we studied H_2O_2 because H_2O_2 is cell-membrane permeable, it is a more stable ROS than $^{\circ}\text{O}_2^-$ or OH^- , and it plays an important role in intracellular signaling.

Materials and methods

Animals

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Clinical Research Institute of Montreal (IRCM) and was carried out according to recommendations of the Canadian Council of Animal Care. Sixteen-week-old male Wistar–Kyoto rats (WKY) and SHR ($n = 10/\text{group}$) (Taconic Farms Inc., Germantown, New York, USA) were studied. Rats were killed by decapitation.

Cell culture

Vascular smooth muscle cells (VSMC) derived from mesenteric arteries were isolated and characterized as described previously [20,21]. Briefly, mesenteric arteries were cleaned of adipose and connective tissue and VSMC were dissociated by the enzymatic digestion of vascular arcades. The tissue was filtered and the cell suspension centrifuged and resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium containing heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), HEPES, L-glutamine, penicillin, and streptomycin. VSMC were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% FBS and maintained at 37°C in a humidified incubator (5% $\text{CO}_2/95\%$ air). Early passaged cells (passages 3 to 6) were used. Before experimentation, cells were rendered quiescent by serum deprivation for 24 h.

Western blot analysis of MAP kinases

Quiescent VSMC were stimulated and then washed with cold PBS. Lysis buffer (Na pyrophosphate 50 mmol/l, NaF 50 mmol/l, NaCl 50 mmol/l, EDTA 5 mmol/l, EGTA 5 mmol/l, Na_3VO_4 2 mmol/l, HEPES pH 7.4, 10 mmol/l, Triton X-100 0.1%, PMSF 50 mmol/l, pepstatin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added. Plates were placed on dry ice for 5 min and allowed to thaw. Cells were scraped off and sonicated for 5 s. The protein supernatant was separated by centrifugation, and protein concentrations were determined using the Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Equal amount of proteins were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (Boehringer, Mannheim, Laval, Quebec, Canada) for 1 h at 100 V. Membranes were blocked with blocking buffer, containing tris-buffered saline, 0.1% Tween-20 with 5% w/v non-fat dry milk for 1 h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with anti-phospho-specific ERK1/2 antibody (Thr202/Tyr204) and anti-phospho-specific p38MAP kinase antibody (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) (1 : 1000). Membranes were then incubated with secondary antibodies (1 : 2000) for 1 h at room temperature and incubated with Blotting Substrate (Roche, Indianapolis, Indiana, USA) following the manufacturer's protocol. Membranes were re-incubated with anti- α actin antibody. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence, exposed to film and blots were analysed densitometrically (Image-Quant software; Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA).

Experimental protocol

Cells were stimulated with H_2O_2 for 2–30 min. H_2O_2 was used at 10^{-4} mol/l, because we and others previously reported maximal effects at this concentration [22]. The role of tyrosine kinases and PKC in MAP kinase phosphorylation was determined using selective pharmacological inhibitors, tyrphostin A23 (10^{-5} mol/l) and GF109203X (10^{-5} mol/l), respectively. To assess whether H_2O_2 -induced ERK1/2 and p38MAPK activation is mediated via EGFR kinase, PDGFR kinase or IGFR kinase, we used the selective inhibitors AG1478, AG1296 and AG1024 (10^{-5} mol/l), respectively. Finally, to determine the role of the NRTK in the activation of ERK1/2 and p38MAP kinase, selective inhibitors of Src (PP2) and JAK2 (AG490) (10^{-5} mol/l) were used. PP3, an inactive analogue was used as a negative control. Previous studies demonstrated that at the doses used, the pharmacological agents are selective [23]. VSMC were pre-treated with pharmacological inhibitors for 30 min before H_2O_2 addition.

Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times. Results are presented as means \pm SEM and compared

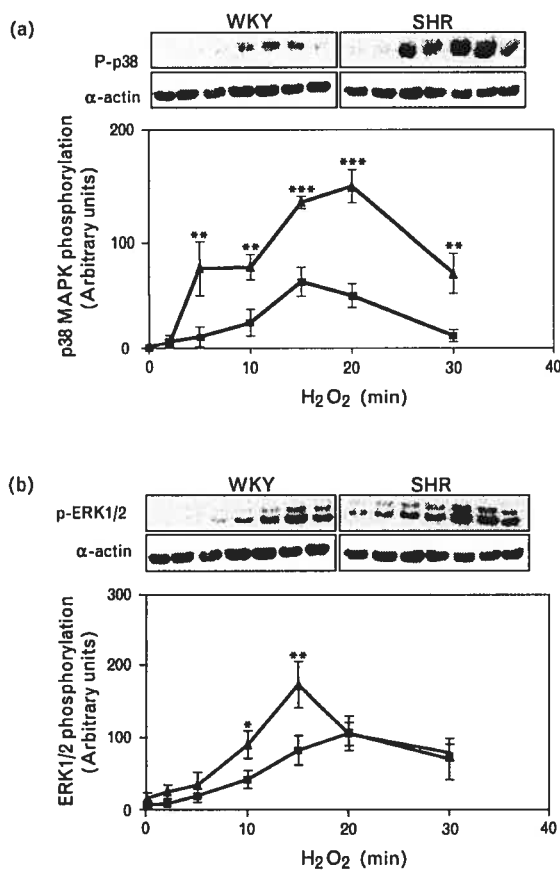
by analysis of variance. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of H_2O_2 on ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in VSMC from WKY and SHR

H_2O_2 stimulation resulted in a slow and sustained increase in ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in WKY and SHR VSMC. Maximal responses were obtained within 10–20 min after H_2O_2 stimulation (Fig. 1). H_2O_2 -mediated effects were significantly greater in cells from SHR compared with WKY ($P < 0.01$).

Fig. 1

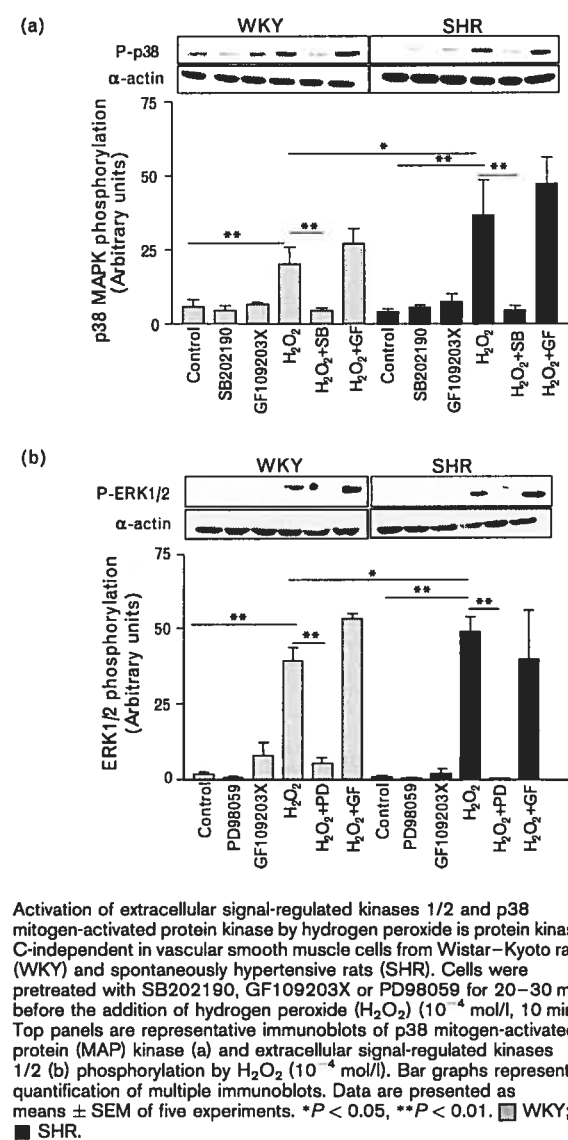


Effect of hydrogen peroxide on extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Top panels are representative immunoblots of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase (a) and extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 (b) phosphorylation by hydrogen peroxide (H_2O_2) (10^{-4} mol/l). Membranes were probed with phospho-specific antibodies and re-probed with anti- α actin antibody to assess protein loading. Line graph demonstrates time-dependent effect of H_2O_2 . Each data point is the mean \pm SEM of five experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus WKY counterpart. —■— WKY; —▲— SHR.

Activation of ERK1/2 and p38MAP kinase by H_2O_2 is PKC independent and tyrosine kinase-dependent

To determine whether PKC is an upstream regulator of H_2O_2 -induced activation of ERK1/2 and p38MAP kinase, cells were treated with GF109203X, a selective PKC inhibitor. The phosphorylation of both MAP kinases was not significantly altered by GF109203X (Fig. 2), suggesting that pathways other than PKC regulate H_2O_2 -induced phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase in VSMC. To verify the functional integrity of ERK1/2 and p38MAP kinase pathways, we also examined the effects of SB202190, a selective p38MAP kinase

Fig. 2



Activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase by hydrogen peroxide is protein kinase C-independent in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Cells were pretreated with SB202190, GF109203X or PD98059 for 20–30 min before the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) (10^{-4} mol/l, 10 min). Top panels are representative immunoblots of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase (a) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (b) phosphorylation by H_2O_2 (10^{-4} mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means \pm SEM of five experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. □ WKY; ■ SHR.

inhibitor, and PD98059, selective inhibitor of the ERK1/2 pathway. SB202190 and PD98059 abrogated H₂O₂-induced phosphorylation of p38MAP kinase and ERK1/2, respectively. Neither GF109203X, PD98059 nor SB202190 influenced basal phosphorylation of MAP kinases.

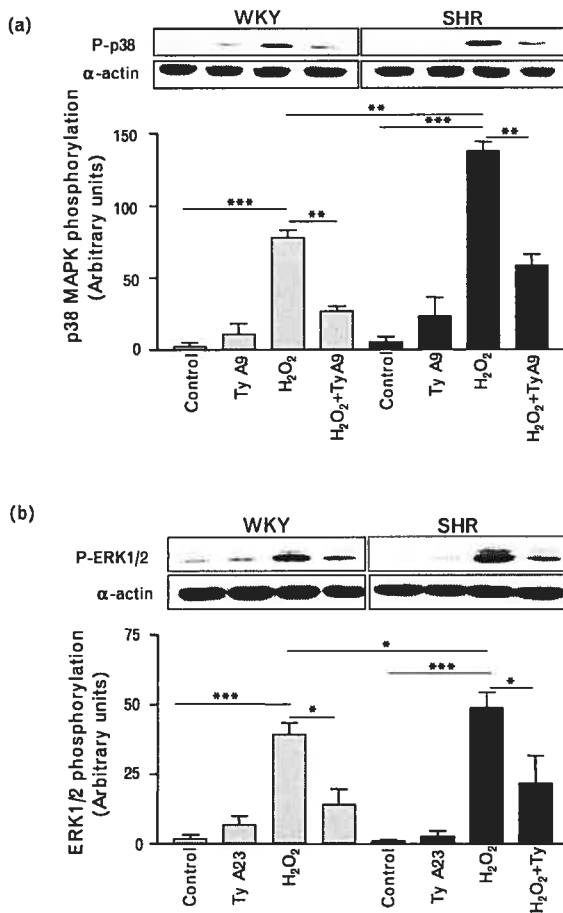
To evaluate the role of protein tyrosine kinases in H₂O₂-mediated activation of MAP kinases, VSMC were exposed to two different protein tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin A9 and tyrphostin A23. Pretreatment of

cells with tyrphostins significantly attenuated the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase (Fig. 3). Neither tyrphostin A9 nor tyrphostin A23 influenced basal MAP kinase phosphorylation.

Role of EGFR, PDGFR and IGFR tyrosine kinases in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H₂O₂

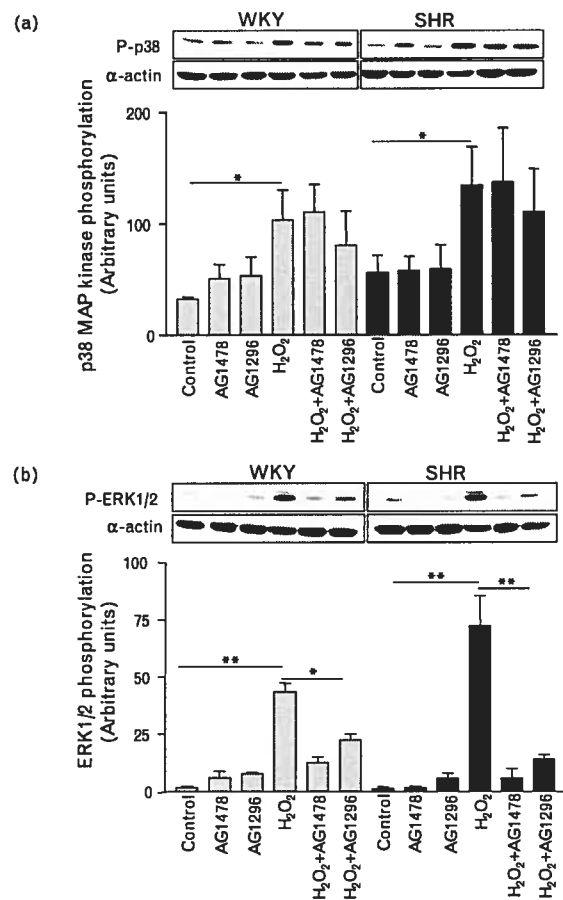
To test whether RTK are involved in H₂O₂-induced MAP kinase activation, we pre-treated VSMC with AG1478, AG1296 and AG1024, which are specific inhibitors of EGFR, PDGFR and IGFR, respectively. AG1478,

Fig. 3



Role of tyrosine kinases in extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation by hydrogen peroxide in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Cells were pretreated with tyrphostin A9 or tyrphostin A23 for 30 min before the addition of hydrogen peroxide (H₂O₂) (10⁻⁴ mol/l, 10 min). Top panels are representative immunoblots of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase (a) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of five experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. □ WKY; ■ SHR.

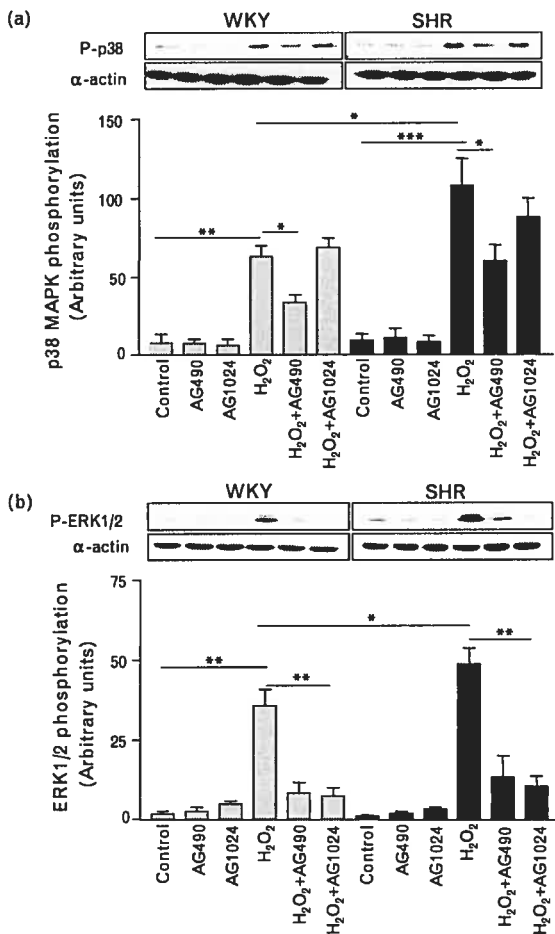
Fig. 4



Role of epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinases in extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide. Cells were pretreated with AG1478 or AG1296 for 30 min before the addition of hydrogen peroxide (H₂O₂) (10⁻⁴ mol/l, 10 min). Top panels are representative immunoblots of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase (a) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (b) phosphorylation by H₂O₂ (10⁻⁴ mol/l). Bar graphs represent quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means ± SEM of five experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. □ Wistar-Kyoto rats (WKY); ■ spontaneously hypertensive rats (SHR).

AG1296 and AG1024 significantly reduced H_2O_2 -mediated activation of ERK1/2 in SHR and WKY VSMC (Fig. 4b and Fig. 5b) but did not influence p38MAP kinase phosphorylation (Fig. 4a and Fig. 5a). Although these RTK inhibitors attenuated H_2O_2 -induced ERK1/2 phosphorylation, the effects were not completely abolished, indicating that H_2O_2 activates ERK1/2 only partly through RTK.

Fig. 5

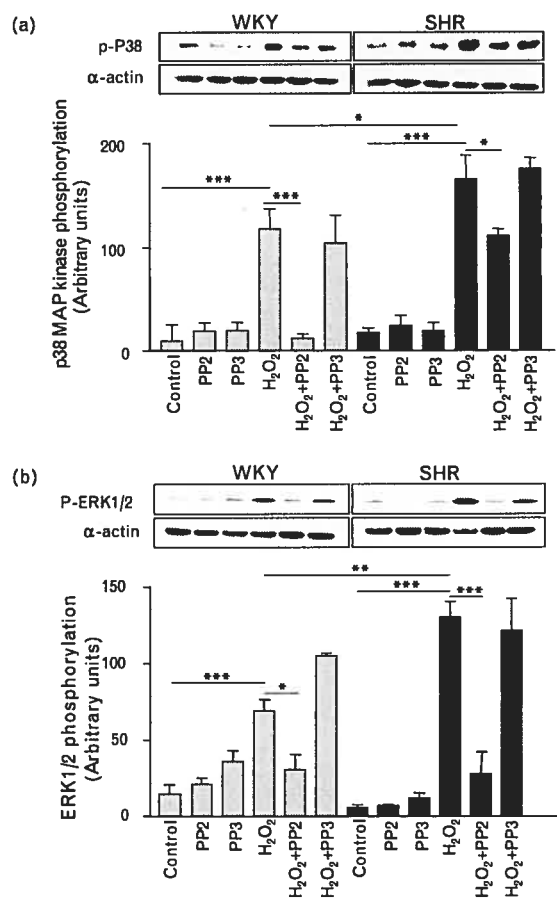


Role of JAK2 in insulin-like growth factor receptor in extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Cells were pretreated with AG490 or AG1024 for 30 min before the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) (10^{-4} mol/l, 10 min). Top panels are representative immunoblots of p38 mitogen-activated protein kinase (a) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (b) phosphorylation by H_2O_2 (10^{-4} mol/l). Bar graphs represent the quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means \pm SEM of five experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. \square WKY; \blacksquare SHR.

Non-receptor tyrosine kinases, Src and JAK2, are implicated in ERK1/2 and p38MAP kinase activation by H_2O_2

As shown in Fig. 5, AG490, a selective JAK2 inhibitor, significantly reduced the phosphorylation of ERK1/2 ($P < 0.01$) and p38MAP kinase ($P < 0.05$). Similar results were obtained with the specific Src inhibitor, PP2 (Fig. 6). The pretreatment of cells with PP2 reduced H_2O_2 -mediated activation of ERK1/2 and p38MAP kinase. PP3, an inactive analogue, was used as a negative control and did not influence MAP kinase phosphorylation by H_2O_2 (Fig. 6).

Fig. 6



Src family tyrosine kinases are implicated in extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide. Cells were pretreated with PP2 (Src inhibitor) or PP3 (inactive analogue) for 30 min before the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) (10^{-4} mol/l, 10 min). Top panels are representative immunoblots of p38 mitogen-activated protein kinase (a) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (b) phosphorylation by H_2O_2 (10^{-4} mol/l). Bar graphs represent the quantification of multiple immunoblots. Data are presented as means \pm SEM of five experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. \square Wistar-Kyoto rats (WKY); \blacksquare spontaneously hypertensive rats (SHR).

Discussion

Major findings from the present study demonstrate that H_2O_2 induces activation of ERK1/2 and p38MAP kinase through tyrosine kinase-dependent, PKC-independent pathways in VSMC. ERK1/2 and p38MAP kinase are differentially regulated by H_2O_2 because both RTK and NRTK influence ERK1/2 activation, whereas only NRTK are implicated in p38MAP kinase phosphorylation. VSMC from SHR exhibited enhanced H_2O_2 -mediated MAP kinase activation, indicating hyperresponsiveness of redox-sensitive vascular processes. Our findings underscore the importance of tyrosine kinases, but not of PKC, in ROS regulation of ERK1/2 and p38MAP kinase in VSMC. Upregulation of these redox-dependent processes in SHR may contribute to ERK1/2 and p38MAP kinase-related VSMC growth and inflammation in hypertension.

ROS activate MAP kinases in many cell types [24–30]. Our results demonstrate that H_2O_2 induces a time-dependent increase in the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase in mesenteric VSMC, with enhanced responses in SHR. H_2O_2 was used at a concentration of 10^{-4} mol/l, which we previously demonstrated, from full dose–response curves, yields maximal responses [22]. Although this dose is not a physiological concentration, under pathological conditions, such as in ischaemia–reperfusion injury and in vascular damage associated with hypertension, diabetes and atherosclerosis, vascular H_2O_2 can increase to levels within the μ molar range [31–33]. MAP kinase effects were not immediate, but were slow and sustained, particularly in SHR cells, with maximal activation occurring after 10 min stimulation. This temporal pattern may reflect the time for cell membrane permeabilization of exogenously added H_2O_2 or the possibility that H_2O_2 -induced MAP kinase responses only become evident once intracellular antioxidant systems have been saturated. Not all studies demonstrated the activation of MAP kinases by ROS. In rat aortic smooth muscle cells, ROS did not influence ERK1/2 phosphorylation [24], and in angiotensin II-stimulated VSMC only p38MAP kinase was activated by ROS [6,14,27]. These discrepancies may relate to differences in the species of oxygen-free radicals generated, the concentration of ROS and intracellular compartmentalization of ROS. Enhanced activation of MAP kinases by H_2O_2 in SHR could have important functional consequences because oxidative stress is increased in SHR VSMC [34–36] and because ERK1/2 and p38MAP kinase are critically involved in VSMC growth and inflammation [8,37].

Molecular mechanisms underlying the H_2O_2 -stimulated activation of MAP kinases in VSMC have not been fully elucidated. ROS may influence MAP kinases directly through oxidation/reduction of MAP kinases themselves, or indirectly through upstream regulators, such as PKC,

tyrosine kinases and protein phosphatases. Here we evaluated the role of PKC and tyrosine kinases using a pharmacological approach.

PKC, a ubiquitously expressed family of kinases, comprise at least 12 isoforms [38,39]. PKC regulates many signaling molecules including MAP kinases [40]. The activation of PKC is redox-sensitive in some, but not all, cell types and sensitivity to ROS appears to depend on specific isozymes. In the present study, GF109203X, a selective PKC inhibitor, did not alter H_2O_2 -induced phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase, indicating that MAP kinase regulation by ROS in VSMC occurs through PKC-independent pathways. In support of our findings, others reported that GF109203X does not block H_2O_2 -induced Akt activation in VSMC [41] and in A10 VSMC, PKC is an upstream modulator of increased ERK1/2 phosphorylation, but not of p38MAP kinase in response to H_2O_2 [40]. However, many studies reported that PKC is an important intermediate in MAP kinase stimulation by ROS [28,42]. The possible reasons for these conflicting results may be a differential regulation in different cell types and the variable activation of PKC isoforms by different species of free radicals.

Whereas PKC inhibition did not alter MAP kinase status, the inhibition of tyrosine kinases with two different tyrosine kinase inhibitors, tyrphostin A9 and A23, markedly reduced H_2O_2 -induced phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase, demonstrating the importance of tyrosine kinases in MAP kinase activation by ROS in mesenteric VSMC. To investigate in greater detail which of the many tyrosine kinases are involved, we used selective inhibitors of RTK (EGFR, IGFR, PDGFR) and NRTK (Src and JAK2). Previous studies demonstrated that RTK are targets of ROS, and that activated tyrosine kinases in turn stimulate the generation of ROS through activation of NADPH oxidase [6,16,17]. We and others reported that angiotensin II activates MAP kinases in VSMC through redox-sensitive pathways involving EGFR and IGFR transactivation [6]. Saito *et al.* [43] reported that PDGFR is activated by ligand-independent transactivation through H_2O_2 . Here we show that selective inhibitors of EGFR, PDGFR and IGFR attenuate H_2O_2 -induced activation of ERK1/2, but not of p38MAP kinase. These findings suggest that ERK1/2, but not p38MAP kinase, is regulated by redox-sensitive activation of RTK. On the other hand, inhibition of the NRTK, Src and JAK2, significantly attenuated both ERK1/2 and p38MAP kinase phosphorylation in WKY and SHR cells. Mechanisms whereby ROS-regulated Src and JAK2 influence MAP kinases may involve common targets upstream of MAP kinases. Although it is beyond the scope of the present study to identify such targets, possible candidates include protein phosphatases [44], because (1) these molecules are directly regulated by oxidation/reduction through protein modification of

cysteine residues; (2) protein phosphatases are downstream of tyrosine kinases; and (3) MAP phosphatases are upstream modulators of ERK1/2 and p38MAP kinase. These aspects await further clarification.

In conclusion, we demonstrate that in VSMC H₂O₂ induces the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAP kinase through tyrosine kinase-dependent, PKC-independent pathways. Whereas NRTK are important in p38MAP kinase activation by H₂O₂, both RTK and NRTK are important in ERK1/2 activation. The up-regulation of H₂O₂-mediated MAP kinase stimulation may contribute to enhanced signalling by ERK1/2 and p38MAP kinase in SHR. Our findings highlight the key role of tyrosine kinases, rather than PKC, in redox activation of MAP kinases and add new mechanistic insights into MAP kinase signalling associated with enhanced ROS action in hypertension.

References

- Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003; **1**:91–106.
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Griendling K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998; **32**:488–495.
- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 1992; **70**:593–599.
- Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, *et al.* Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circ Res* 2001; **89**:39–46.
- Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; **272**:18515–18517.
- Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signalling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; **81**:159–167.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; **122**:339–352.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; **22**:153–183.
- Nicol RL, Frey N, Pearson G, Cobb M, Richardson J, Olson EN. Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2001; **20**:2757–2767.
- English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *J Biol Chem* 1999; **274**:31588–31592.
- Abe J, Kusahara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 1996; **271**:16586–16590.
- Xu Q, Liu Y, Gorospe M, Udelsman R, Holbrook NJ. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996; **97**:508–514.
- Touyz RM, Descheppe C, Park JB, He G, Chen X, Neves MF, *et al.* Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2002; **20**:1127–1134.
- Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer H, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**:940–948.
- Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL. Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* 1999; **277**:L282–L291.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279**:L1005–L1028.
- Yang S, Hardaway M, Sun G, Ries WL, Key LL Jr. Superoxide generation and tyrosine kinase. *Biochem Cell Biol* 2000; **78**:11–17.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; **82**:47–95.
- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; **91**:406–413.
- Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Mesenteric vascular smooth muscle cells from SHR display increased Ca²⁺ responses to angiotensin II but not to endothelin-1. *J Hypertens* 1994; **12**:663–673.
- Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance vessels. *Circulation* 1999; **99**:392–399.
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; **44**:200–208.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000; **351**:95–105.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1998; **273**:15022–15029.
- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, *et al.* Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 1997; **100**:1813–1821.
- Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1997; **80**:383–392.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996; **271**:4138–4142.
- Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades RA. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **19**:324–332.
- Abe MK, Chao TS, Solway J, Rosner MR, Hershenson MB. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; **11**:577–585.
- Song HJ, Lee TS, Jeong JH, Min YS, Shin CY, Sohn UD. Hydrogen peroxide-induced ERK activation in cultured feline ileal smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **312**:391–398.
- Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**:1362–1369.
- Zulueta JJ, Sawhney R, Yu FS, Cote CC, Hassoun PM. Intracellular generation of reactive oxygen species in endothelial cells exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1997; **272**:L897–L902.
- Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Lutty GA. Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem* 1994; **269**:24156–24162.
- Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, Diaz J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; **35**:1055–1061.
- Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diaz J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001; **38**:1395–1399.
- Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antoniali MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. *Cardiovasc Res* 2004; **61**:22–29.
- Torres M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci* 2003; **8**:d369–d391.
- Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci* 2004; **117**:131–132.
- Rybin VO, Guo J, Sabri A, Elouardighi H, Schaefer E, Steinberg SF. Stimulus-specific differences in protein kinase C delta localization and activation mechanisms in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**:19350–19361.
- Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Distinct roles of Ca²⁺, calmodulin, and protein kinase C in H₂O₂-induced activation of ERK1/2, p38 MAPK, and protein kinase B signaling in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* 2004; **6**:353–366.
- Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED. Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *Exp Biol Med* 2003; **228**:836–842.

