

Université de Montréal

**Régulation du récepteur natriurétique de type C par le monoxyde
d'azote dans les cellules musculaires lisses vasculaires**

par
Maria Arejian



Département de Physiologie

Faculté de Médecine

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

Avril, 2007

© Maria Arejian, 2007



AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Régulation du récepteur natriurétique de type C par le monoxyde d'azote dans les
cellules musculaires lisses vasculaires**

présenté par :

Maria Arejian

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Rémy Sauvé, président-rapporteur

Dr. Madhu Anand-Srivastava, directrice de recherche

Dr. Josette Noël, membre du jury

RÉSUMÉ

Le peptide natriurétique auriculaire (ANP), un membre de la famille des peptides natriurétiques, régule une variété de fonctions physiologiques en interagissant avec les récepteurs des peptides natriurétiques (NPR) localisés à la surface de la membrane plasmique. Il existe trois isoformes des NPR: NPR-A, NPR-B et NPR-C. Les NPR-A et les NPR-B sont des récepteurs transmembranaires avec une activité guanylate cyclase intrinsèque alors que le NPR-C est un récepteur transmembranaire qui ne possède pas d'activité guanylate cyclase. Ce récepteur est principalement couplé à la voie de l'inhibition de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire des protéines G inhibitrices (Gi). Le NPR-C et sa voie de signalisation de l'adénylate cyclase sont régulés par une variété de facteurs hormonaux tels que l'angiotensine II, l'endothéline et l'arginine-vasopressine. De plus, une altération de l'expression des protéines Gi, de l'activité de l'adénylate cyclase et des taux intracellulaires d'AMPC a été observée dans un ensemble de conditions pathologiques incluant l'hypertension. Les études récentes de notre laboratoire ont démontré que le traitement des rats avec du N⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la synthèse du NO, engendre l'augmentation de la pression artérielle et de l'expression des protéines Gi α ainsi que l'atténuation de l'inhibition de l'adénylate cyclase activée par le NPR-C. Il n'est toutefois pas connu si l'atténuation de l'inhibition de l'adénylate cyclase observée dans les rats L-NAME est attribuable à la diminution de l'expression de la protéine NPR-C. Puisque le L-NAME est l'inhibiteur de la synthèse du NO, il se pourrait que l'ensemble des effets observés dans les rats L-NAME soient causés par les faibles niveaux du NO. Dans cette étude, nous avons examiné l'effet d'une augmentation du NO sur l'expression et la signalisation du NPR-C dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Le traitement des CMLV de type A10 avec du SNAP, un donneur de NO, a diminué en fonction du temps l'expression du NPR-C, de Gi α -2 et Gi α -3, avec une inhibition maximale de 25 à 35%. La diminution de l'expression du NPR-C par le SNAP a précédé la baisse de l'expression des protéines Gi. La diminution des protéines Gi α -2 et Gi α -3 a été observée après 6 h de traitement, alors que l'inhibition de l'expression du NPR-C a été constatée après 2 h. Cette baisse de l'expression du NPR-C n'était pas accompagnée

par l'atténuation de l'inhibition de l'adénylate cyclase couplée au NPR-C. Cette observation pourrait être due aux niveaux non altérés des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ après 2 h. Par ailleurs, après 24 h de traitement des CMLV au SNAP, une diminution simultanée de l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ et du NPR-C ainsi qu'une atténuation de l'inhibition de l'adénylate cyclase induite par le NPR-C ont été observées. De plus, l'ODQ, l'inhibiteur de la guanylate cyclase soluble (GCs), et le KT5823, l'inhibiteur de la protéine kinase G, n'ont pas affecté la diminution de l'expression de la protéine NPR-C. Également, le MnTBAP, un chélateur de la molécule du peroxy-nitrite, n'a pas renversé la diminution de l'expression du NPR-C au niveau témoin. Le SNAP a également diminué le degré de phosphorylation des «*mitogen-activated protein kinases*» (MAPK), comme celui de «*extracellular signal-regulated kinase*» (ERK1/2), «*c-Jun N-terminal kinase*» (JNK) et «*p38 kinase*» (p38). De plus, l'ODQ, le KT5823 et le MnTBAP n'ont pas influencé la diminution du degré de phosphorylation des MAPK. L'ensemble de ces résultats démontre que le NO diminue l'expression du NPR-C par un mécanisme indépendant de la $GMPc$ et que la diminution du NPR-C et des protéines $G_{i\alpha}$ induite par le NO suit une relation temporelle. En conclusion, il peut être suggéré que la régulation négative des protéines NPR-C et G_i par le NO pourrait représenter un mécanisme additionnel par lequel NO régule la pression artérielle.

Mots clés : NO, NPR-C, protéines G, adénylate cyclase, $GMPc$, MAPK, CMLV

SUMMARY

Atrial natriuretic peptide (ANP), a member of the family of natriuretic peptides (NP), regulates a variety of physiological functions by interacting with membrane natriuretic peptide receptors NPR-A, NPR-B and NPR-C. The NPR-A/ NPR-B have intrinsic guanylyl cyclase activity, whereas NPR-C lacks guanylyl cyclase activity and is coupled to adenylyl cyclase inhibition through inhibitory guanine nucleotide regulatory protein ($G_i\alpha$). The NPR-C and associated adenylyl cyclase signaling has been reported to be regulated by various hormonal factors such as angiotensin II, endothelin, arginine-vasopressin. Furthermore, alterations in the levels of $G_i\alpha$ proteins, adenylyl cyclase activity and cAMP levels have been documented in various pathological states, including hypertension. We have recently shown that inhibition of NO synthase by N⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment results in the augmentation of blood pressure, enhanced expression of $G_i\alpha$ proteins and attenuation of NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase. However, whether this attenuation is attributed to the decrease in NPR-C protein expression is not known. Since L-NAME is the inhibitor of NO synthase and results in the attenuation of NO levels, it may be possible that the decreased levels of NO may be responsible for the observed changes in L-NAME hypertensive rats. The present studies were therefore undertaken to investigate the modulation of NPR-C expression and associated adenylyl cyclase signaling by NO in vascular smooth muscle cells (VSMC).

Treatment of aortic VSMC and A10 VSMC with SNAP, an NO donor, decreased the expression of NPR-C, $G_i\alpha-2$ and $G_i\alpha-3$ proteins in a time-dependant manner. The maximal inhibition was between 25-30%. The decreased expression of $G_i\alpha$ proteins was observed at 6 h, whereas, the decrease in NPR-C protein expression was observed at 2 h. The decreased expression of NPR-C protein at 2 h when the levels of $G_i\alpha$ were not altered was not reflected in NPR-C-mediated attenuation of adenylyl cyclase activity. However, at 24 h, when the levels of both NPR-C and $G_i\alpha$ were decreased, NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase was completely abolished. Furthermore, ODQ, an inhibitor of soluble guanylyl cyclase, and KT5823, an inhibitor of protein kinase G,

were unable to restore the NO-induced decreased expression of NPR-C protein to control levels, suggesting that NO-induced decreased expression of NPR-C protein was not mediated through a cGMP-dependent mechanism. In addition, MnTBAP, a scavenger of peroxynitrite, was unable to restore to control levels the NO-induced decreased expression of NPR-C protein, suggesting that peroxynitrite is not implicated in NO-induced decreased expression of NPR-C. NO also decreased the activation status of MAPK such as p-ERK1/2, p-JNK and p-p38 in VSMC, which were not restored to control levels by ODQ and MnTBAP. These results indicate that NO decreases NPR-C protein expression by cGMP-independent mechanisms and that the decreased expression of NPR-C and Gi proteins by NO follows a temporal relationship. It could thus be suggested that NO-induced downregulation of NPR-C and Gi proteins that results in an augmentation of cAMP levels may be an additional mechanism through which NO regulates blood pressure.

Keywords: NO, NPR-C, G proteins, Adenylyl cyclase, cGMP, MAPK, VSMC

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Summary	v
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xiv
Liste des abréviations	xv
Dédicace	xviii
Remerciements	xix
CHAPITRE 1	1
Introduction et Revue de la littérature	1
1- Système cardiovasculaire	2
1.1- Structure des vaisseaux sanguins	2
1.2- Pression artérielle	3
1.3- Mécanismes de régulation de la pression artérielle	3
1.3.1- Mécanismes de régulation à court terme	4
1.3.1.1- Mécanismes nerveux	4
1.3.1.2- Mécanismes chimiques	5
1.3.2- Mécanismes de régulation à long terme	6
1.4- Variations de la pression artérielle	6
1.4.1- Hypotension	7
1.4.2- Hypertension	7
1.5- Types d'hypertension	7
1.6- Causes favorisant une hypertension essentielle	8
1.7- Conséquences de l'hypertension	8
1.7.1- Complications cardiaques	8
1.7.2- Complications neurologiques	9
1.7.3- Complications rénales	9

1.8- Traitements pharmacologiques de l'hypertension	9
1.8.1- Traitement lié au régime alimentaire et aux habitudes de vie	9
1.8.2- Traitement médicamenteux	9
2- Signalisation transmembranaire et système adénylate cyclase	10
2.1- Descriptions générales	10
2.2- Récepteurs couplés aux protéines G	11
2.3- Protéines G	13
2.3.1- Structure	13
2.3.2- Activation des protéines G	13
2.3.3- Fonctions des protéines G	15
2.3.4- Régulation des protéines G	15
2.4- Adénylate cyclase	16
2.4.1- Structure	16
2.4.2- Isoformes	17
2.4.3- Activation	17
2.4.4- Fonctions	17
2.4.5- Régulation de l'activité de l'AC	18
2.4.5.1- Régulation par les protéines G	18
2.4.5.2- Régulation par divers agents	18
2.5- Altérations du système AC dans la pathologie de l'hypertension	20
3- Peptides natriurétiques	20
3.1- ANP	20
3.2- BNP	21
3.3- CNP	22
3.4- Récepteurs natriurétiques	22
3.4.1- NPR-A et NPR-B	22
3.4.1.1- Structure et distribution	22
3.4.1.2- Fonctions et voie de signalisation du NPR-A et du NPR-B	23
3.4.2- NPR-C	24

3.4.2.1- Structure, distribution, fonctions	24
3.4.2.2- Voie de signalisation du NPR-C	26
3.4.2.2.1- Voie de signalisation NPR-C/AC	26
3.4.2.2.2- Voie de signalisation NPR-C/PLC	27
3.4.2.2.3- NPR-C et autres voies de signalisation	28
3.4.2.3- Régulation de l'expression et de la voie de signalisation du NPR-C	28
3.4.2.3.1- Interaction entre le NPR-A et le NPR-C	29
3.4.2.4- Régulation du NPR-C dans les conditions pathologiques	29
4- Monoxyde d'azote	30
4.1- Structure et propriétés	30
4.2- Synthèses du monoxyde d'azote	31
4.2.1- Structure et descriptions générales	31
4.2.2- Réaction catalytique de la NOS	32
4.2.3- Régulation de l'activité de la NOS	33
4.2.3.1- Rôle des flavines FAD et FMN dans l'activité de la NOS	33
4.2.3.2- Rôle de la calmoduline dans l'activité de la NOS	33
4.2.3.3- Rôle du groupement hème dans l'activité de la NOS	33
4.2.3.4- Rôle de la BH ₄ et de la L-arginine dans l'activité de la NOS	33
4.2.3.5- Inhibiteurs de la NOS	34
4.2.4- Isoformes de la NOS	34
4.2.4.1- Descriptions générales	34
4.2.4.2- eNOS	35
4.2.4.3- nNOS	37
4.2.4.4- iNOS	38
4.3- Voie de métabolisme et d'élimination du NO	38
4.4- Voies de signalisation du NO	39
4.4.1- Voie de signalisation dépendante de la GMPc	39
4.4.2- Voie de signalisation indépendante de la GMPc	42
4.5- Fonctions physiologiques du NO	42
4.5.1- Fonctions dans le système cardiovasculaire	43

4.5.2- Fonctions dans le système immunitaire	43
4.5.3- Fonctions dans le système nerveux	44
4.6- Fonctions pathologiques du NO	44
4.7- Dysfonctionnement endothélial et hypertension	45
4.8- Traitements thérapeutiques du NO	46
5- Voie de signalisation des MAPK	47
5.1- Descriptions générales	47
5.2- Activation de la voie des MAPK	47
5.2.1- Activation par les récepteurs à activité tyrosine kinase	47
5.2.2- Activation par les récepteurs couplés aux protéines G	48
5.3- Isoformes des MAPK	49
5.3.1- ERK1/2	49
5.3.2- JNK	50
5.3.3- p38	51
5.3.4- ERK5	52
5.4- MAPK et pathologies cardiovasculaires	53
6- Objectifs	54
CHAPITRE 2	55
Nitric oxide modulates the expression and signaling of natriuretic peptide receptor C in aortic vascular smooth muscle cells	55
Abstract	56
Introduction	57
Material and Methods	59
Results	62
Discussion	65
References	69
Figure legends	73
Figures	76

CHAPITRE 3	83
Discussion Générale et Conclusion	83
Discussion	84
Perspectives.....	93
Conclusion	95
RÉFÉRENCES	96

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1. Structure des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	12
Figure 2. Cycle d'activation et d'inactivation des protéines G	14
Figure 3. Structure des récepteurs des peptides natriurétiques	24
Figure 4. Voies principales de signalisation du récepteur natriurétique de type C (NPR-C)	27
Figure 5. Structure de la synthase du monoxyde d'azote (NOS)	31
Figure 6. Réaction catalytique de la synthase du monoxyde d'azote (NOS)	32
Figure 7. Structure de la guanylate cyclase soluble (GCs)	40
Figure 8. Mécanismes de vasorelaxation induite par la voie 3',5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) du monoxyde d'azote (NO)	41
Figure 9. Voie d'activation des différentes isoformes des « <i>mitogen-activated protein kinases</i> » (MAPK)	51

Chapitre 2

Figure 1. Time course of SNAP treatment on NPR-C protein expression in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC)	76
Figure 2. Effect of SNAP on C-ANP ₄₋₂₃ -mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC)	77
Figure 3. Time Course of SNAP treatment on the expression of Gi α -2 and Gi α -3 protein in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC)	78

Figure 4. Effect of ODQ, KT5823 and MnTBAP on SNAP-induced decreased expression of NPR-C protein in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC)	79
Figure 5. Effect of SNAP, ODQ and KT5823 on ERK1/2, JNK and p38 phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC)	80
Figure 6. Effect of MnTBAP on SNAP-induced decreased phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 in vascular smooth muscle cells (VSMC)	81
Figure 7. Schematic model showing potential mechanisms responsible for the antihypertensive effect of nitric oxide (NO) in the attenuation of blood pressure	82

Chapitre 3

Figure 1. Schéma récapitulatif de l'effet du N^6 -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) et du monoxyde d'azote (NO) sur le récepteur natriurétique de type C (NPR-C), les protéines $G_i\alpha$ et de l'interrelation entre le NPR-C et le récepteur natriurétique de type A (NPR-A)	92
---	----

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I. Distribution et régulation des différentes isoformes de l'adénylate cyclase. 19

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A10 VSMC	CMLV provenant de l'aorte thoracique de rats embryonnaires
AC	adénylate cyclase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANP	peptide natriurétique auriculaire
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterine
BNP	peptide natriurétique du cerveau
C-ANP ₄₋₂₃	des[Gln ¹⁸ , Ser ¹⁹ , Gly ²⁰ , Leu ²¹ , Gly ²²] ANP ₄₋₂₃ -amide C-ANP
CNP	peptide natriurétique de type C
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires
DAG	diacylglycérol
DOCA-salt	modèle de rats hypertendus au sel du déoxycorticostérone
EGF	facteur de croissance épidermal
eNOS	NOS endothéliale
ERK1/2	« <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> »
ERK5	« <i>extracellular signal-regulated kinase 5</i> »
FAD	flavine adenine dinucléotide
FMN	flavine mononucléotide
FSK	forskoline
GCs	guanylate cyclase soluble
GDP	guanosine diphosphate
Gi	protéine G inhibitrice
GMP	guanosine monophosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
Gs	protéine G stimulatrice
GTP	guanosine triphosphate

GTP γ S	guanosine 5'-O-(3'thiotriphosphate)
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
iNOS	NOS inductible
IP3	inositol 1,4,5 triphosphate
JNK	« <i>c-Jun N-terminal kinase</i> »
kDa	kiloDalton
L-NAME	N ⁶ -nitro-L-arginine methyl ester
MAPK	« <i>mitogen-activated protein kinases</i> »
MAPKK ou MEK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
Mm Hg	millimètre de mercure
MnTBAP	Mn(111)tetralis (benzoic acid porphyrin)
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydase
nNOS	NOS neuronale
NO	monoxyde d'azote
NOS	synthase du monoxyde d'azote
NPR-A/B/C	récepteurs des peptides natriurétiques de type A, B, C
ODQ	1 <i>H</i> [1,2,4]oxadiazole[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-one
p38	« <i>p38 stress-activated kinase</i> »
PDE	phosphodiesterase
PDGF	facteur dérivé des plaquettes
PI3K	phosphoinositol-3-kinase
PIP ₂	phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase dépendante du calcium
PKG	protéine kinase dépendante de la GMPc
PLC	phospholipase C
Rats L-NAME	Rats traités au L-NAME
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
SHR	modèle de rats spontanément hypertendus

SNAP	<i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acetylpenicillamine
SNP	sodium nitroprusside
TGF β	« <i>transforming growth factor β</i> »
VSMC	vascular smooth muscle cells
WKY	rats Wistar-Kyoto

DÉDICACE

*À mes parents, pour leurs amour et support toujours
inconditionnels qui agrémentent le parcours de ma vie.*

*To my exceptional parents who have provided me unconditional
love and support, I dedicate this thesis to you!*

«There is no friendship, no love, like that of the parent for the child»

Henry Ward Beecher

1813-1887

REMERCIEMENTS

De prime abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dr. Madhu Anand-Srivastava, qui m'a permis de poursuivre mes études graduées dans son laboratoire de recherche. Dr. Anand-Srivastava, un gros merci pour vos conseils, votre encadrement et votre contribution au développement de mon sens critique et scientifique.

En second lieu, je remercie Dr. Josette Noël et Dr. Rémy Sauvé d'avoir accepté de faire partie de mon groupe de jury. Mes sincères remerciements à tous mes collègues du laboratoire : George, Grace, Ingrid, Louis-Olivier, Magda, Marcel, Soumyo et Yuan qui m'ont fourni de l'aide, de la patience et surtout de l'amitié. Je tiens à exprimer ma gratitude à Mme Joanne Payette qui m'a attribué des conseils ainsi que du support moral tout au long de mon séjour au niveau de la maîtrise.

J'exprime mes profonds remerciements à mes parents pour le dévouement et l'encouragement qu'ils m'ont accordés tout au long de ma vie. J'aimerais également exprimer ma gratitude envers ma grande famille composée de ma grand-mère, mes tantes, mes oncles, mes cousin(e)s ainsi qu'à mes bon(ne)s et meilleur(e)s ami(e)s; Merci pour le soutien que vous m'avez offert durant mes longues années d'étude. Je remercie Magda et Mme Aline pour l'appui et l'aide qu'elles m'ont donnés durant ma période de rédaction. J'aimerais également remercier toute personne qui m'a accordé du soutien de façon directe ou indirecte au courant de ma formation universitaire. En dernier lieu et non le moindre, je remercie Dieu!

CHAPITRE 1

INTRODUCTION & REVUE DE LITTÉRATURE

1- SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

Le système cardiovasculaire est un système composé de vaisseaux sanguins qui permettent de distribuer le sang riche en oxygène du cœur jusqu'aux tissus périphériques et de ramener le sang pauvre en oxygène des tissus vers le cœur. Les vaisseaux sanguins représentent donc un réseau de conduits important qui commence et termine au cœur et qui permet la circulation du sang à travers l'organisme. Les vaisseaux sanguins se divisent en trois catégories : artères, capillaires et veines. Les artères transportent le sang riche en oxygène en provenance du cœur et se ramifient en capillaires. Ces derniers permettent l'échange de nutriments et de gaz avec les cellules et se fusionnent pour former les veines, qui amènent le sang vers le cœur (1).

1.1- STRUCTURE DES VAISSEAUX SANGUINS

La paroi des artères et des veines est constituée de trois tuniques : la tunique interne, la tunique moyenne et la tunique externe alors que la paroi des capillaires est seulement composée de la tunique interne.

La tunique interne forme une surface lisse de cellules endothéliales qui entoure la lumière de tous les vaisseaux. La fonction de cette couche est de minimiser la force de friction du sang de la surface interne des vaisseaux. Cette monocouche de cellules endothéliales, aussi appelée endothélium vasculaire, comporte à sa surface plusieurs récepteurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle, tels que les récepteurs à l'acétylcholine, à l'angiotensine, à la noradrénaline mais possède aussi divers enzymes comme la synthase du monoxyde d'azote et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (2,3).

La tunique moyenne est principalement composée de cellules musculaires lisses. Cette tunique est la couche la plus épaisse dans les artères. Elle est innervée par les neurofibres vasomotrices du système nerveux sympathique. Suivant les besoins de l'organisme, le système nerveux sympathique envoie par l'intermédiaire des neurofibres, des influx aux cellules musculaires lisses pour causer soit la vasodilatation (augmentation du diamètre des vaisseaux) ou soit la vasoconstriction (diminution du

diamètre des vaisseaux) des vaisseaux sanguins. La tunique moyenne est donc très importante à l'échelle de la régulation de la pression artérielle et du débit sanguin. Les cellules musculaires lisses formant la tunique moyenne présentent à leurs surfaces une variété de récepteurs tels que les récepteurs à l'angiotensine, aux peptides natriurétiques et à l'endothéline (3,4).

La tunique externe est formée des fibres de collagène qui ont le rôle de protéger les vaisseaux et de les ancrer aux structures avoisinantes. Cette couche est innervée de neurofibres et de vaisseaux lymphatiques. La tunique externe des gros vaisseaux, les artères et les veines, est également parcourue par des petits vaisseaux sanguins qui nourrissent les cellules de la surface externe de cette tunique (1).

1.2- PRESSION ARTÉRIELLE

La pression artérielle, aussi appelée tension artérielle, est la pression du sang exercée sur la paroi des artères. La lecture de la pression artérielle se décompose en pression artérielle systolique et en pression artérielle diastolique. La pression artérielle systolique représente la pression du sang sur la paroi des artères durant la contraction du ventricule gauche, alors que la pression artérielle diastolique reflète la pression du sang sur les artères lorsque le ventricule gauche est en repos (1).

1.3- MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA PRESSION ARTÉRIELLE

La pression artérielle est régulée par deux types de mécanismes : les mécanismes de régulation à court terme et les mécanismes de régulation à long terme. La régulation des fluctuations ponctuelles de la pression artérielle par le système nerveux et par certaines substances hématogènes compose les mécanismes de régulation à court terme. Par ailleurs, les mécanismes de régulation à long terme régissent la pression artérielle en modulant l'activité des reins.

1.3.1- Mécanismes de régulation à court terme

1.3.1.1- Mécanismes nerveux

Les mécanismes nerveux de régulation à court terme ont le rôle de distribuer le sang de manière adéquate pour répondre aux besoins de l'organisme et de maintenir une pression artérielle stable tout en modifiant le diamètre des vaisseaux sanguins.

Le centre vasomoteur est une région du bulbe rachidien qui régit les changements de diamètre des vaisseaux sanguins. Il est constitué de neurones sympathiques qui transmettent des influx nerveux aux muscles lisses des artérioles. Le centre vasomoteur dirige, via ses neurofibres vasomoteurs sympathiques, le degré de vasoconstriction des artérioles en affectant la libération d'un vasoconstricteur puissant, la noradrénaline. Une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique provoque une élévation de la relâche de la noradrénaline par le centre vasomoteur, induisant la vasoconstriction des artérioles et donc l'élévation de la pression artérielle. Contrairement, une diminution de l'activité sympathique provoque la relâche de l'acétylcholine, causant ainsi la dilatation des muscles lisses des artérioles et une baisse de la pression artérielle. L'activité du centre vasomoteur est influencée par les barorécepteurs et les chimiorécepteurs (1).

Les barorécepteurs sont des récepteurs qui répondent aux variations de la pression artérielle. Ces derniers se situent dans les sinus carotidiens, le sinus de l'aorte ainsi que dans les parois des grosses artères du cou et du thorax. En cas d'une augmentation de la pression artérielle, les barorécepteurs s'étirent, transmettent des influx nerveux au centre vasomoteur et induisent l'inhibition du centre vasomoteur. Cette inhibition provoque la baisse de la relâche de la noradrénaline et donc la vasodilatation des artérioles et la baisse de la pression artérielle (1).

Les chimiorécepteurs sont des récepteurs qui réagissent aux fluctuations des concentrations d'oxygène et de gaz carbonique dans le sang. Ces récepteurs se situent principalement dans la crosse de l'aorte et les sinus carotidiens, à proximité des barorécepteurs. Lorsque la concentration en oxygène diminue dans le sang, les chimiorécepteurs stimulent le centre vasomoteur, et par conséquent, favorise la vasoconstriction des artérioles. Cette dernière entraîne la hausse de la pression artérielle

qui s'ensuit par une hausse du débit cardiaque. L'augmentation du débit cardiaque permet l'apport additionnel d'oxygène dans le sang mais permet aussi l'accélération du retour du sang riche en gaz carbonique dans le cœur et aux poumons. Le retour rapide du sang favorise l'oxygénation du sang et l'apport essentiel d'oxygène aux tissus périphériques (1).

1.3.1.2- Mécanismes chimiques

Autres que l'oxygène et le gaz carbonique, certaines substances qui circulent dans le sang peuvent également influencer la pression artérielle. Ces molécules plasmatiques médient leurs actions vasoactives en agissant directement sur les cellules vasculaires musculaires lisses ou sur le centre vasomoteur. Parmi ces substances, les hormones sont une des plus importantes dans la régulation de la pression artérielle. L'adrénaline, la noradrénaline, l'angiotensine, la vasopressine et l'endothéline sont tous des exemples d'hormones qui influencent la régulation de la pression artérielle.

En situation de stress, l'adrénaline et la noradrénaline, deux hormones importantes libérées par la glande surrénale, provoquent une vasoconstriction. Ces dernières agissent sur les récepteurs α -adrénergiques des cellules vasculaires musculaires lisses des artérioles et induisent leur effet vasoconstricteur, tout en augmentant la pression artérielle. D'autre part, lorsque la pression artérielle chute de façon importante, la vasopressine est relâchée par l'hypothalamus. Cette hormone réduit la diurèse, augmentant ainsi le volume sanguin, un déterminant important de la pression artérielle. Ce phénomène provoque une vasoconstriction des artérioles et par conséquent, engendre l'élévation de la pression artérielle.

La diminution du débit cardiaque cause la relâche d'endothéline par les cellules endothéliales. Cette hormone affecte les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et engendrent une vasoconstriction. De plus, l'angiotensine II, un peptide important produit par les reins, est impliquée dans la régulation de la pression artérielle à court terme et à long terme. Elle augmente la tension artérielle en induisant la vasoconstriction des artérioles (1).

1.3.2- Mécanismes de régulation à long terme

Le contrôle de la pression artérielle pour des périodes prolongées est maintenu par les reins. La pression artérielle est dépendante du débit cardiaque, quantité de sang éjectée par le cœur en une minute. Par conséquent, tout facteur qui influence ce paramètre altère directement la pression artérielle. Le volume sanguin, étant un déterminant marquant du débit cardiaque, représente un paramètre important dans le maintien de l'homéostasie de la pression artérielle. Une augmentation du volume sanguin provoque l'accumulation excessive de liquide dans les vaisseaux. Ceci entraîne la hausse du débit cardiaque et par conséquent, l'augmentation de la pression artérielle. Suivant la même logique, une baisse du volume sanguin est suivie par une baisse de la pression artérielle. Pour contrer ces déséquilibres, les reins, régissent le volume sanguin, afin de maintenir les limites normales de la pression artérielle. La hausse du volume sanguin amène les reins à diminuer celui-ci en stimulant la formation de filtrat et l'élimination de liquide dans l'urine. De même, la chute du volume sanguin déclenche la rétention d'eau par les reins. Ce phénomène augmente le volume sanguin et par conséquent cause la hausse de la pression artérielle.

Les reins non seulement maintiennent l'homéostasie de la pression artérielle en modifiant le volume sanguin mais contrôlent celle-ci par un mécanisme hormonal faisant intervenir le système rénine-angiotensine. Lorsque la pression artérielle diminue, les reins libèrent de la rénine. Cette dernière stimule la formation d'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, qui stimule l'augmentation de la pression artérielle. L'angiotensine II stimule à son tour la relâche de l'aldostérone et de la vasopressine, qui eux favorisent la réabsorption d'eau et de sodium, amenant ainsi l'élévation du volume sanguin et de la pression artérielle (1).

1.4- VARIATIONS DE LA PRESSION ARTÉRIELLE

Le maintien d'une pression artérielle adéquate est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Les limites normales de la pression artérielle chez un individu varient entre 110 et 140 millimètre de mercure (mm Hg) pour la pression systolique et entre 70 et 80 mm Hg pour la pression diastolique. Des changements infimes au niveau des diamètres

des vaisseaux sanguins peuvent entraîner des variations considérables de la pression artérielle.

1.4.1- Hypotension

L'hypotension correspond à une baisse de la pression artérielle. Cette situation se traduit par une valeur de la pression systolique inférieure à 100 mm Hg et par une valeur inférieure à 70 mm Hg pour la pression diastolique. Dans la majorité des cas, l'hypotension résulte d'une situation précise et ne porte pas à conséquence. Un individu anémique ou avec des problèmes aux glandes thyroïdes peut par exemple éprouver des symptômes d'hypotension chronique, alors qu'un individu en état de choc éprouverait l'hypotension artérielle aiguë (1).

1.4.2- Hypertension

L'hypertension, ou haute pression artérielle, est considérée par des valeurs de la pression artérielle systolique supérieures à 140 mm Hg et par une pression diastolique supérieure à 90 mm Hg. Des élévations transitoires de la pression artérielle ne porte pas à l'inquiétude, néanmoins, une pression artérielle élevée de manière chronique est une situation grave qui porte à conséquences. L'hypertension persistante augmente les risques de développement de maladies vasculaires, de l'insuffisance rénale et d'un accident vasculaire cérébrale. Plus la pression artérielle est haute, plus grands sont les risques de complications cardio-vasculaires, rénales et cérébrales (1,3). L'hypertension est souvent accompagnée d'anormalités métaboliques comme une intolérance au glucose, une sensibilité à l'insuline, à l'obésité et à une dyslipidémie (5).

1.5- TYPES D'HYPERTENSION

L'hypertension est catégorisée en deux grandes classes. L'hypertension est dite de type essentiel, lorsqu'aucune cause précise n'est responsable de l'apparition de la maladie. Lorsque les causes responsables de l'apparition de l'hypertension sont identifiables chez un individu, l'hypertension est de type secondaire. L'hypertension essentielle est incurable par contre, elle peut être stabilisée au moyen de médicaments, d'un régime particulier et d'exercice. Les facteurs de cause à l'origine de l'hypertension secondaire

peuvent être traités de façon définitive par des médicaments. L'hypertension est essentielle dans la très grande majorité des cas (95%), alors que 5% des cas cliniques sont dus à l'hypertension secondaire (6). La grossesse et certaines conditions rénales ou endocriniennes telles que l'hypersécrétion de rénine ou l'hyperthyroïdie, peuvent être les facteurs de cause de l'hypertension secondaire. Un individu ayant une prédisposition héréditaire à faire de la haute pression artérielle manifeste l'hypertension essentielle (1,7).

1.6- CAUSES FAVORISANT UNE HYPERTENSION ESSENTIELLE

Bien que la cause précise de l'hypertension essentielle reste inconnue dans la majorité des cas, il existe toutefois des facteurs de risques qui peuvent contribuer à la manifestation de cette maladie. Un régime alimentaire riche en sodium et en graisses saturées fait partie des facteurs favorisant l'hypertension. L'âge, le sexe, le stress, le tabagisme, la race et l'hérédité sont tous des facteurs de risques. De plus, l'hypertension est une maladie multifactorielle c'est-à-dire, la coexistence de plusieurs facteurs de risques chez un même patient peut contribuer à la manifestation de cette pathologie (1,6).

1.7- CONSÉQUENCES DE L'HYPERTENSION

Lorsque l'hypertension n'est pas maîtrisée par un suivi régulier, elle peut avoir des complications cardiaques, neurologiques et rénales.

1.7.1- Complications cardiaques

Lorsque le cœur travaille à haute pression pour une longue période de temps, le surcroît de travail entraîne une hypertrophie du cœur. Les cavités cardiaques se dilatent et le muscle cardiaque outrepassé sa capacité de pomper le sang avec un débit sanguin stable, faisant apparaître les signes d'insuffisance cardiaque. L'hypertension facilite aussi la formation de dépôt lipidique dans les vaisseaux sanguins et provoque l'athérosclérose. À mesure que les vaisseaux sanguins s'obstruent, les probabilités de développer un infarctus du myocarde augmentent (1,7).

1.7.2- Complications neurologiques

L'hypertension atteint fréquemment le système nerveux central. Elle se manifeste par la survenue d'un accident vasculaire cérébral hémorragique, par une rupture d'un vaisseau cérébral ou par l'obstruction d'une artère à cause d'un caillot sanguin. L'hypertension peut aussi atteindre le système vasculaire de l'œil en engendrant des modifications rétiniennes (1, 7).

1.7.3- Complications rénales

Au niveau des reins, l'hypertension artérielle favorise la survenue d'une insuffisance rénale. Les CMLV des vaisseaux peuvent s'hypertrophier et éclater. À long terme, les reins perdent leur capacité de réguler le volume sanguin et par conséquent, la pression artérielle (1, 7).

1.8- TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES DE L'HYPERTENSION

L'hypertension artérielle essentielle est incurable mais peut être contrôlée par plusieurs moyens. Le traitement vise à normaliser les valeurs de la pression systolique et diastolique, afin de prévenir les complications subséquentes.

1.8.1- Traitement lié au régime alimentaire et aux habitudes de vie

Un régime alimentaire faible en sel, en gras et en cholestérol, la perte de poids, l'abandon du tabagisme et la maîtrise du stress peuvent parfois suffire à normaliser la pression artérielle (1, 7).

1.8.2- Traitement médicamenteux

Les médicaments diurétiques, les bloqueurs des récepteurs β -adrénergique, les inhibiteurs calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine font partie des médicaments anti-hypertenseurs. Les diurétiques diminuent le volume sanguin par perte d'eau et de sodium, induisant conséquemment la baisse de la pression artérielle. Les bloqueurs des récepteurs β -adrénergique agissent en diminuant l'activité des catécholamines sur le cœur et réduisent la sécrétion de rénine. Les inhibiteurs calciques inhibent le transport transmembranaire du calcium, réduisant ainsi la capacité

vasoconstrictrice des fibres vasculaires musculaire lisse. En dernier lieu, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine empêchent la stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone et réduisent les taux circulants d'angiotensine et d'aldostérone (1).

2- SIGNALISATION TRANSMEMBRANAIRE ET SYSTÈME ADÉNYLATE CYCLASE

2.1- DESCRIPTIONS GÉNÉRALES

Les stimuli extracellulaires hydrophiles ne peuvent traverser la membrane plasmique lipophile de la cellule. Le message de ceux-ci doit donc traverser la cellule par l'intermédiaire d'un système de signalisation transmembranaire. Cette voie de signalisation est constituée de trois éléments : un récepteur, une protéine G et un effecteur. Chaque constituant de cette voie joue un rôle important dans la transduction efficace des signaux extracellulaires à l'intérieur de la cellule. Les récepteurs membranaires permettent le passage de l'information véhiculée par le signal extracellulaire vers le cytoplasme, sans que le ligand ne pénètre à l'intérieur de la cellule cible. Les protéines G convoient le signal reçu par les récepteurs jusqu'aux protéines ou enzymes effectrices (adénylate cyclase (AC); phospholipase C (PLC)) jouant ainsi le rôle de transducteur dans la cascade de signalisation. En dernier, les effecteurs produisent des seconds messagers qui activent une variété de cibles intracellulaires dans le but d'exercer des réponses physiologiques.

Parmi les voies de signalisation transmembranaire, la voie de l'adénylate cyclase (AC) est celle la mieux caractérisée et étudiée. Elle médie les réponses physiologiques d'une variété d'hormones et de neurotransmetteurs. L'AC constitue une famille d'enzymes membranaires qui transforme l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate 3' 5' cyclique (AMPc). L'AMPc produit par cette enzyme permet la

transduction et la transformation du message extracellulaire en actions physiologiques. Chaque composante de ce système sera détaillée dans les prochaines sections.

2.2- RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) font partie d'une famille de protéines possédant sept domaines transmembranaires. Ces récepteurs sont dépourvus d'activité enzymatique intrinsèque mais sont couplés à des systèmes enzymatiques via les protéines G. Les RCPG sont constitués de trois segments : le segment extracellulaire (extrémité N-terminale), le segment intracellulaire (extrémité C-terminale) et le segment transmembranaire. Le segment extracellulaire des RCPG est un domaine avec une séquence d'acides aminés variable qui possède majoritairement des sites pour la *N*-glycosylation, une réaction qui affecte l'expression et l'activité des RCPG. Le segment intracellulaire des RCPG est un domaine constitué d'une séquence invariable d'acides aminés. Ce segment possède des sites pour la phosphorylation et la palmitoylation, deux réactions importantes pour les phénomènes de désensibilisation et d'internalisation des récepteurs. Le segment transmembranaire est formé de sept hélices qui traversent la membrane sept fois. Ces sept hélices transmembranaires sont reliées entre elles par trois boucles intracellulaires (i1, i2, i3) et trois boucles extracellulaires (e1, e2, e3) (**Figure 1A**). La lumière, les neurotransmetteurs, les hormones, les neuropeptides et les glycoprotéines (hormone lutéinisante, thyrotrophine, hormone folliculo-stimulante (8)) sont tous des stimuli qui activent les RCPG (9). La fixation du ligand au domaine extracellulaire provoque le déplacement des hélices transmembranaires les unes par rapport aux autres, d'où un changement conformationnel du récepteur, provoquant l'activation et l'association des protéines G au domaine intracellulaire plus précisément, aux boucles intracellulaires i2 et i3 (10). Les récepteurs α_2 -adrénergiques, de l'angiotensine II, les récepteurs dopaminergiques de type D2, les récepteurs de l'endothéline de type B et les récepteurs muscariniques de type 2 et 4 sont tous des exemples de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Bien que la cascade de signalisation des protéines G soit majoritairement activée par les RCPG à sept domaines transmembranaires, il a été démontré que les récepteurs à un domaine transmembranaire (**Figure 1B**) peuvent également activer les protéines G

comme dans le cas du récepteur natriurétique de type C et du récepteur de l'insuline (11,12).

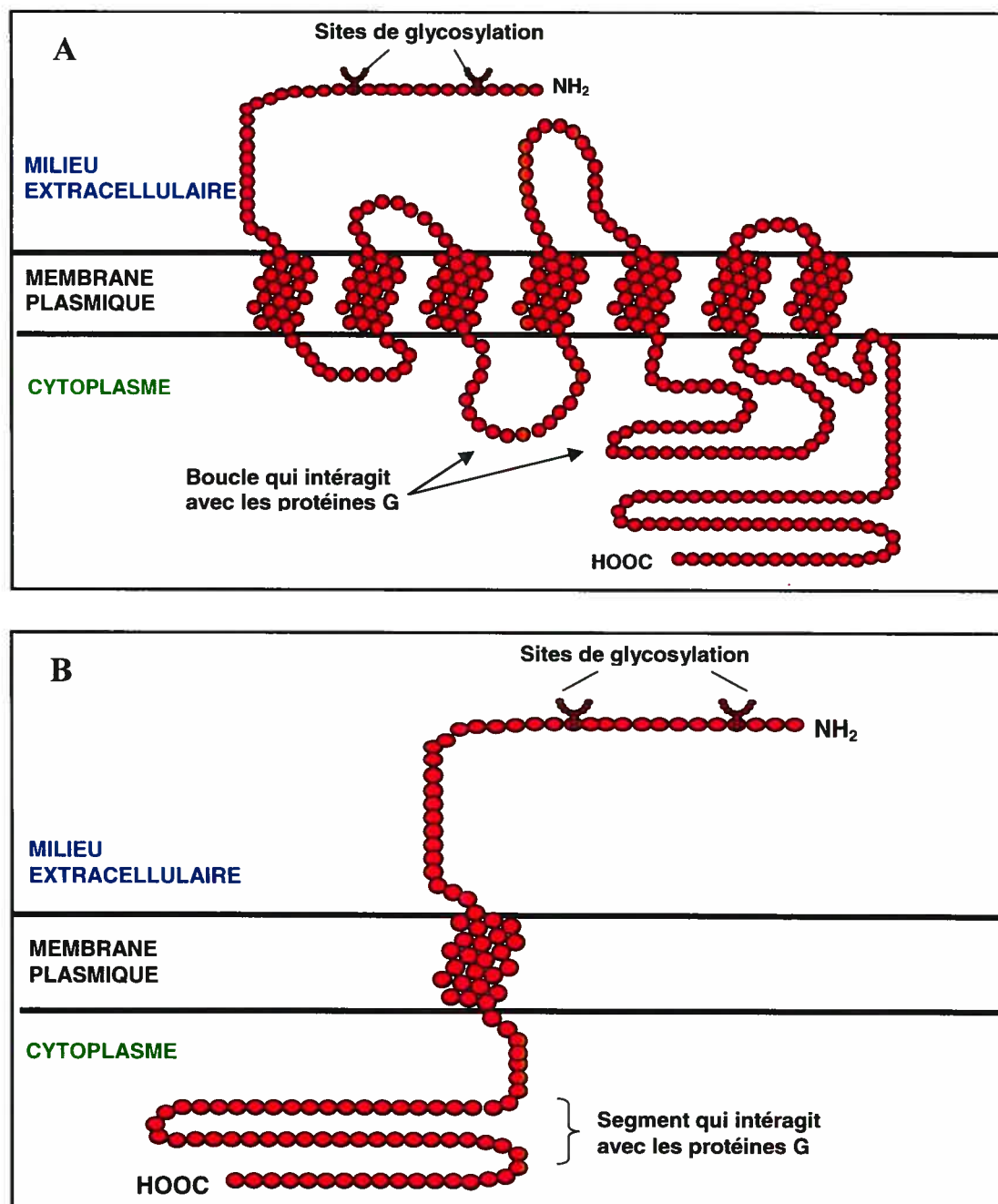


Figure 1. Structure des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

(A) RCPG à sept domaines transmembranaires

(B) RCPG à un domaine transmembranaire

2.3- PROTÉINES G

2.3.1- Structure

Les protéines G appartiennent à une famille de protéines avec activité GTPase faible, capable d'hydrolyser la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Il existe deux grandes classes de protéines G : les protéines G hétérotrimériques et les protéines G cytosoliques. Les protéines G hétérotrimériques sont des protéines ancrées à la surface cytosolique de la membrane plasmique et sont constituées de trois sous-unités: α , β et γ . D'autre part, les protéines G cytosoliques¹ (20-30 kiloDalton (kDa)) sont des petites protéines monomériques impliquées dans la régulation de processus intracellulaires (9). La sous-unité α des protéines G membranaires (40-46 kDa) confère la spécificité de la protéine G et elle fixe les nucléotides guanyliques, soit le GTP ou soit le GDP. Parmi les protéines G hétérotrimériques, les protéines G stimulatrices (Gs) et les protéines G inhibitrices (Gi) sont celles impliquées dans la voie de l'AC. Il existe quatre isoformes de la sous-unité α des protéines Gs issues de l'épissage alternatif d'un seul gène, alors qu'il existe trois isoformes de la sous-unité α des protéines Gi, Gi α -1, Gi α -2 et Gi α -3, chacun provenant de l'épissage d'un gène différent. La sous-unité α est en contact direct avec la sous-unité β mais n'interagit pas avec la sous-unité γ . Par ailleurs, les sous-unités β (35-36 kDa) et γ (8-9 kDa) sont constamment associées et restent liées lorsqu'elles exercent leurs effets de signalisation. En d'autres termes, les sous-unités $\beta\gamma$ sont considérées comme une unité fonctionnelle (9).

2.3.2- Activation des protéines G

Au repos, les trois sous-unités des protéines G sont associées et la sous-unité α porte le GDP. Lorsque le RCPG lie un ligand, la conformation du RCPG se modifie lui permettant de s'associer à la protéine G. L'interaction avec le récepteur pousse la protéine G à échanger son GDP contre un GTP et par conséquent active la protéine G. L'activation de cette dernière aboutit à la dissociation du trimère en sous-unité α et en

¹ Les protéines G cytosoliques ne seront pas détaillées dans les prochaines sections et ne font pas sujet de notre étude. Par conséquent, toute mention du terme 'protéine G' dans les prochaines sections se réfère exclusivement aux protéines G hétérotrimériques (membranaires).

sous-unité $\beta\gamma$. La sous-unité α garde sa conformation active tant qu'elle est associée au GTP par contre, lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, la sous-unité α revient à son état initial inactif et s'associe de nouveau à la sous-unité $\beta\gamma$ (**Figure 2**) (13).

Il est à noter que plusieurs types de récepteurs peuvent activer simultanément le même sous-type de protéine G. En d'autres termes, deux récepteurs différents peuvent activer tous les deux l'AC en activant chacun un ensemble de protéines Gs. Dans les hépatocytes, par exemple, l'activation des récepteurs β -adrénergiques et de glucagon active les protéines Gs lors du processus de la dégradation du glycogène. La quantité d'AMPc produite par ces deux récepteurs est la somme d'AMPc produit séparément par chaque récepteur (13,14).

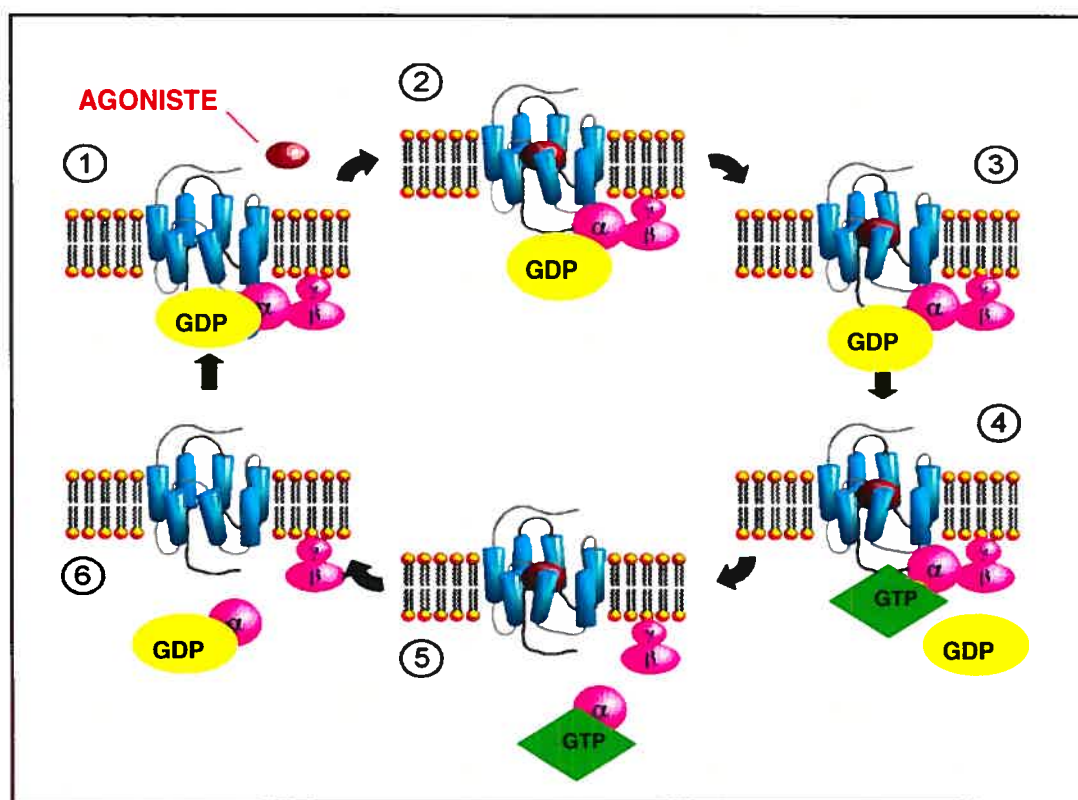


Figure 2. Cycle d'activation et d'inactivation des protéines G

Abréviations: GTP, guanosine triphosphate; GDP, guanosine diphosphate.

Schéma modifié de : www.answers.com/topic/g-protein

2.3.3- Fonctions des protéines G

La sous-unité α liée au GTP se lie à des protéines effectrices, comme des enzymes (AC) ou des canaux ioniques, et elle modifie leurs activités. Les enzymes cellulaires activées par la sous-unité α provoquent la formation et la mise en jeu de seconds messagers tel que l'AMPc. Ces derniers sont des signaux chimiques intracellulaires permettant d'activer une variété de substrats cytoplasmiques. Les protéines G peuvent également agir autrement qu'en activant l'AC. Elles peuvent stimuler l'ouverture des canaux potassiques dans les cellules cardiaques comme elles peuvent activer la voie de signalisation de la PLC faisant intervenir les seconds messagers d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG) (14).

Il a été autrefois documenté que seulement les sous-unités α des protéines G peuvent activer les molécules effectrices. Néanmoins, il a été découvert que le complexe $\beta\gamma$ peut également stimuler des canaux potassiques, des canaux calciques, des phospholipases ainsi que réguler soit négativement ou soit positivement l'activité de certaines isoformes de l'AC (15).

2.3.4- Régulation des protéines G

L'activité des protéines G peut être altérée par certaines toxines bactériennes. La bactérie *Vibrio cholerae* qui cause la maladie intestinale du choléra produit une toxine cholérique protéique de 87 kDa. Une fois à l'intérieur de la cellule, cette toxine catalyse le transfert de l'unité adénosine diphosphate (ADP)-ribose du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) sur la chaîne latérale d'une arginine de la sous-unité α de la protéine Gs. Cette réaction irréversible entraîne l'activation continue de la protéine Gs car celle-ci devient incapable d'hydrolyser le GTP en GDP. En conséquence, la toxine cholérique engendre l'activation constante de l'AC et la production de haute concentration d'AMPc (environ 100 fois plus que la normale). Par ailleurs, la bactérie *Bordetella pertussis* responsable de la coqueluche produit la toxine pertussique qui catalyse l'ADP-ribosylation de la sous-unité α de la protéine Gi. Cette réaction irréversible empêche l'activation de la protéine Gi car cette toxine inhibe le transfert du

GDP en GTP de la sous-unité α de la protéine G_i . Par conséquent, la protéine G_i ne peut inhiber l'activité de l'AC (14).

L'expression des protéines G peut aussi être modifiée par certaines conditions pathologiques ainsi que par certains peptides vasoactifs. Dans les conditions de défaillance cardiaque, de diabète et d'hypertension, les niveaux d'expression des protéines G_s et G_i sont altérés. En effet, dans le modèle expérimental de rats spontanément hypertendus (SHR), un modèle analogue de l'hypertension essentielle humaine ainsi que dans le modèle expérimental de rats hypertendus par l'ingestion de concentration élevée de sel du déoxycorticostérone (DOCA-salt), les niveaux des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ sont augmentés. De plus, l'angiotensine II et l'endothéline, deux peptides vasoactifs dont les niveaux sont élevés dans la maladie d'hypertension, augmentent l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ dans les CMLV (16,17). La vasopressine, une hormone vasoconstrictrice, augmente l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$, $G_{i\alpha-3}$ et de G_s (18). D'autre part, le peptide natriurétique auriculaire, un peptide vasodilatateur dont les concentrations plasmatiques sont élevées chez les patients hypertendus, diminue l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ dans les CMLV (16).

2.4- ADÉNYLATE CYCLASE

2.4.1- Structure

L'AC est une protéine composée de deux domaines hydrophobes comprenant chacun six hélices transmembranaires (M1 et M2). Les deux domaines sont reliés ensemble par deux boucles hydrophiles situées du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire (C1 et C2). Ces boucles contiennent les sous-unités catalytiques de l'AC. La sous-unité α de la protéine G_s se lie principalement à la boucle C2 alors que, la sous-unité α de la protéine G_i s'associe à la boucle C1 (19).

2.4.2- Isoformes

Chez les mammifères, neuf isoformes d'AC membranaires et une isoforme d'AC soluble ont été isolées et caractérisées. Le profil d'expression et de distribution de l'AC varie en fonction des isoformes. Les isoformes d'AC membranaires sont exprimées de façon ubiquitaire néanmoins, certaines isoformes se localisent majoritairement dans certains tissus spécifiques. L'AC de type 5 et 6 sont par exemple principalement exprimé dans le cœur. Par ailleurs, la forme soluble de l'AC est seulement exprimée dans les organes reproducteurs mâles, les testicules (19).

2.4.3- Activation

Les protéines G agissent en tant que transducteur du signal extracellulaire. Elles sont par conséquent les intermédiaires de l'activation ou de l'inhibition de l'AC. L'association de la sous-unité α (liée au GTP) au domaine catalytique de l'AC résulte dans la modulation de l'activité enzymatique de celle-ci. L'activité de l'AC est contrôlée par deux types de protéines G : Gs et Gi. La stimulation des récepteurs conduit à l'activation des protéines Gi ou Gs et elle résulte ensuite dans la production ou l'inhibition de l'AMPc.

2.4.4- Fonctions

L'AMPc produit par l'AC conduit à l'activation de certaines protéines effectrices spécifiques telles que les protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA). Ces enzymes catalysent la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de diverses molécules cibles dont beaucoup sont des enzymes. L'activation de ces dernières conduit à la stimulation de certains substrats comme des facteurs de transcription, des protéines cytosoliques et nucléaires (13). L'AMPc active également des phosphodiésterases spécifiques qui dégradent ce messager second puisque ce dernier possède une durée d'action très brève et ne s'accumule pas dans le cytoplasme. La succession des réactions biochimiques amorcées par l'AMPc dépend du type de la cellule cible. Une des réponses physiologiques importante que les PKA affectent est la vasodilatation des artères. Ces enzymes diminuent la résistance périphérique en empêchant la phosphorylation des chaînes de myosines légères. Cette action inhibe la vasoconstriction des vaisseaux et

bloque par conséquent la hausse de la pression artérielle. Dans les cellules thyroïdiennes, par exemple, l'AMPc produite en réaction à la liaison de la thyrotrophine favorise la synthèse de la thyroxine. Dans les cellules osseuses et musculaires, l'AMPc produite par la liaison de l'hormone de croissance provoque des réactions de synthèse au cours desquelles les acides aminés forment des protéines tissulaires (1).

2.4.5- Régulation de l'activité de l'AC

2.4.5.1- Régulation par les protéines G

L'activité de chaque isoforme de l'AC est régulée différemment par les protéines G. La sous-unité α de la protéine G_s active toutes les isoformes d'AC membranaire, alors que la sous-unité α de la protéine G_i inhibe seulement les isoformes de type 5 et 6. Autres que les sous-unités α , les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G peuvent également agir comme médiateur intracellulaire en activant à leurs tours les AC de type 2, 4 et 7 ou en inhibant l'isoforme de type 1, 5, 6 et 8 (**Tableau I**) (19). Au cours des différentes étapes de l'activation de ce système, il y a amplification du signal c'est-à-dire chaque complexe ligand/récepteur active de nombreuses protéines G et pendant cette période, chaque protéine G active plusieurs AC catalysant ainsi la synthèse d'un grand nombre de molécules d'AMPc (9).

2.4.5.2- Régulation par divers agents

Autres que les protéines G, l'activation de l'AC peut être régulée par les PKA, les protéines kinases dépendantes du calcium (PKC), la forskoline (FSK) et le calcium. La forskoline active toutes les isoformes de la l'AC sauf celle de type 9. Les PKA inhibent l'activité de l'AC de type 5 et 6 en phosphorylant ces dernières. Les PKC stimulent l'AC de type 1, 2, 3, 5 et 7 et inhibent l'AC de type 4 et 6. Le calcium affecte également l'AC en stimulant (AC type 1, 3, 8) ou en bloquant (AC type 5, 6) l'activité de cette enzyme membranaire. Contrairement aux isoformes membranaires, l'AC soluble peut seulement être régulé par le calcium et le bicarbonate (**Tableau I**) (19).

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

Isoforme	Distribution Tissulaire	Régulation par protéines G	Régulation par protéine kinase	Régulation par calcium
1	Cerveau	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: inhibition	PKC : stimulation	stimulation
2	Cerveau, poumon, muscle squelettique	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: stimulation	PKC : stimulation	_____
3	Cerveau, pancréas, Épithélium olfactaire	G α_s : stimulation	PKC : stimulation	stimulation
4	Ubiquitaire	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: stimulation	PKC : inhibition	_____
5	Cœur, cerveau, rein, poumon, utérus	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: inhibition G α_i : inhibition	PKC : stimulation PKA : inhibition	inhibition
6	Cœur, Rein, Ubiquitaire	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: inhibition G α_i : inhibition	PKC : inhibition PKA : inhibition	inhibition
7	Ubiquitaire surtout cerveau	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: stimulation	PKC : stimulation	_____
8	Cerveau, pancréas	G α_s : stimulation	_____	stimulation
9	Cerveau, muscle squelettique	G α_s : stimulation G $\beta\gamma$: inhibition	_____	_____
Soluble	Testicule	N'est pas régulé par les protéines G	_____	stimulation

(_____) indique effet non observé ou non étudié

Abréviations : PKC, protéine kinase dépendante du calcium; PKA, protéine kinase dépendante de l'AMPc. **Référence**: Sunahara R., Taussig R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling, *Molecular Interventions*. 2002; **2** (3), p. 172.

2.5- ALTÉRATIONS DU SYSTÈME AC DANS LA PATHOLOGIE DE L'HYPERTENSION

Des altérations dans le fonctionnement du système adénylate cyclase sont impliquées dans diverses conditions pathologiques comme l'hypertension (20), l'insuffisance cardiaque (21) et le diabète (22). Tout agent qui modifie l'expression ou l'activité des récepteurs ou des transducteurs couplés à l'AC induit soit une baisse soit une hausse de la production d'AMPc. La baisse continue des niveaux intracellulaires d'AMPc compromet le maintien d'une pression artérielle stable et elle est impliquée dans le développement de la pathogénèse de l'hypertension. Comme mentionné dans les sections précédentes, les PKA permettent de maintenir une pression artérielle normale en diminuant la résistance périphérique des artères. Le manque d'activation des PKA engendré par une baisse d'AMPc entraîne par conséquent, la vasoconstriction et la hausse de la pression artérielle. À cet égard, la diminution de la stimulation de l'AC par certaines hormones comme le glucagon, l'adénosine et l'adrénaline, a été observé dans les cœurs et les aortes de rats hypertendus de type SHR (23) et DOCA-salt (24).

3- PEPTIDES NATRIURÉTIQUES

La famille des peptides natriurétiques est composée de trois membres : le peptide natriurétique auriculaire (ANP), le peptide natriurétique du cerveau (BNP) et le peptide natriurétique de type C (CNP). Ces trois peptides sont encodés par trois gènes différents mais possèdent tous une structure en anneau de 17 acides aminés lié par un pont disulfure (25).

3.1- ANP

L'ANP est synthétisé sous forme de précurseur de grande taille, le préproANP de 151 acides aminés. Le clivage par protéolyse du segment N-terminal du préproANP résulte dans la formation du proANP (126 acides aminés) qui est entreposé majoritairement dans les vésicules des oreillettes du cœur. Dans les conditions physiologiques, ce

peptide se trouve également en faible concentration dans les ventricules et les reins (4). Sous l'effet de la distension des oreillettes, de l'augmentation des forces de cisaillement du sang et de la pression artérielle, le proANP est clivé par une protéase en ANP mature de 28 acides aminés puis, il est sécrété en abondance dans la circulation sanguine. Cette hormone peptidique régule ses fonctions biologiques par mode d'action endocrine et elle possède une demi-vie de 1-3 minutes (26). L'ANP, un puissant vasodilatateur, ajuste la pression artérielle en favorisant la diurèse et la natriurèse, ce qui entraîne une diminution du volume sanguin et par conséquent, de la pression artérielle. Les hormones telles que l'endothéline (27), l'angiotensine (28) et la vasopressine stimulent la sécrétion de l'ANP dans la circulation sanguine (29). L'ANP inhibe la relâche de la rénine et de l'aldostérone et s'oppose à l'action de l'aldostérone. Cette dernière est une hormone qui stimule la réabsorption du sodium et de l'eau par les reins. Enfin, l'ANP produit la vasodilatation des CMLV et il diminue la formation du liquide cérébro-spinal dans l'encéphale (1).

Puisque cette hormone peptidique a des effets anti-hypertensifs, tout dysfonctionnement dans sa synthèse, sa sécrétion ou dans sa biodisponibilité peut contribuer au développement de l'hypertension. À cet effet, il a été démontré que les patients hypertendus démontrent des niveaux d'ANP plasmatiques significativement plus élevés que les patients normotendus. De plus, les modèles animaux d'hypertension, comme les rats hypertensifs SHR ou DOCA-salt possèdent des taux d'ANP plasmatiques supérieurs aux rats ayant une pression artérielle normale (30).

3.2- BNP

Le BNP est une hormone peptidique de 32 acides aminés sécrété principalement par les ventricules du cœur. Le BNP humain est synthétisé en préproBNP de 132 acides aminés et il subit ensuite des modifications post-traductionnelles pour produire le peptide mature. Contrairement à l'ANP, le BNP n'est pas entreposés dans des vésicules (4). La synthèse et la sécrétion de ce peptide se déroule simultanément c'est-à-dire, le BNP est produit puis, il est directement sécrété dans le sang. La demi-vie plasmatique du BNP est d'environ 21 minutes (26). L'augmentation de la pression artérielle et la distension

des ventricules entraînée par la hausse du volume du sang veineux stimule la relâche du BNP par les ventricules (31). À part le cœur, le cerveau humain peut également sécréter du BNP. Les niveaux plasmatiques de BNP augmentent de 200 à 300 fois chez les patients éprouvant la défaillance cardiaque (32).

3.3- CNP

Le CNP est majoritairement produit par le cerveau et les cellules endothéliales. Le précurseur proCNP (103 acides aminés) n'est pas entreposé dans des vésicules. Le clivage du proCNP génère une hormone de 22 acides aminés. Certaines cytokines comme le «*transforming growth factor-β*» (TGFβ) stimule la synthèse et la relâche du CNP. Ce dernier n'induit pas la diurèse et la natriurèse mais il est impliqué dans la vasorelaxation des CMLV. La concentration plasmatique de CNP est très basse dans les conditions normales et très peu élevée dans les cas de défaillance cardiaque (4,33).

3.4- RÉCEPTEURS NATRIURÉTIQUES

Les peptides natriurétiques exercent leurs fonctions physiologiques en se liant sur les récepteurs natriurétiques localisés à la surface de la membrane plasmique. Il existe trois récepteurs natriurétiques qui sont classés en deux catégories : le premier groupe est composé des récepteurs natriurétiques de type A (NPR-A) et de type B (NPR-B) et le second groupe est composé du récepteur natriurétique de type C (NPR-C).

3.4.1- NPR-A et NPR-B

3.4.1.1- Structure et distribution

Le NPR-A et le NPR-B sont des récepteurs à un domaine transmembranaire composés d'un segment extracellulaire (441 acides aminés), d'un segment transmembranaire (21 acides aminés) et d'un segment intracellulaire (568 acides aminés) (34). Ces deux récepteurs ont une activité guanylate cyclase intrinsèque dans leur segment intracellulaire qui hydrolyse le GTP en 3',5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPC) (**Figure 3**). Les domaines transmembranaires et intracellulaires de ces deux récepteurs partagent respectivement 71% d'homologie alors que, l'homologie entre les

domaines extracellulaires de ces récepteurs n'est seulement de 44% (30). Le NPR-A et le NPR-B sont des homodimères de 120 kDa qui sont *N*-glycosylés sur les résidus d'asparagine du domaine extracellulaire (34,35). Il a été documenté que la glycosylation de ces deux récepteurs est importante pour la fixation du ligand à son site de liaison sur le récepteur (36,37). Les NPR-A et les NPR-B sont exprimés majoritairement dans le système cardiovasculaire, les oreillettes, les ventricules, l'aorte, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses des vaisseaux périphériques, les poumons, les reins et la peau (33). Le NPR-B est par contre la forme prédominante du récepteur natriurétique dans le cerveau. L'ANP et le BNP se lient avec une forte affinité au NPR-A alors que, le CNP est plus spécifique pour le NPR-B (4).

3.4.1.2- Fonctions et voie de signalisation du NPR-A et du NPR-B

La liaison des peptides natriurétiques aux NPR-A et NPR-B entraîne l'activation de la guanylate cyclase intrinsèque de ces récepteurs et par conséquent augmente la production de la GMPc. Les cibles moléculaires de la GMPc sont les canaux ioniques voltage-dépendent, les phosphodiésterases dépendantes de la GMPc et les protéines kinases dépendantes de la GMPc (PKG). Une des cibles physiologiques principale du NPR-A est la régulation de la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Dans les CMLV, cet effet est principalement assumé par les PKG. Il existe deux isoformes des PKG : la PKG I et la PKG II. La PKG I est une isoenzyme cytosolique qui est principalement exprimée dans les CMLV, les cardiomyocytes, les plaquettes, les poumons, les glandes surrénales et le cervelet. Par ailleurs, la PKG II est une protéine membranaire absente du système cardiovasculaire qui se localise à haute concentration dans les intestins, les reins, les os et le cerveau (33). La PKG I médie la vasorelaxation en phosphorylant directement les canaux potassiques calcium dépendant (Calcium-activated K⁺ channel). La phosphorylation de ces derniers engendre l'hyperpolarisation de la cellule et par conséquent, inhibe l'entrée du calcium dans la cellule. De plus, la PKG I active le canal du phospholamban entraînant l'augmentation la charge calcique dans le réticulum sarcoplasmique et en conséquence, la séquestration du calcium dans le réticulum sarcoplasmique (38). La PKG I augmente également l'efflux de calcium en activant les canaux calciques (Calcium- ATPase pump) situés à la membrane cellulaire (39) (pour

plus de détails voir figure 8). L'effet net des actions de la PKG I est de diminuer les taux intracellulaires de calcium dans le but d'induire la vasorelaxation des vaisseaux et de maintenir la balance de la pression artérielle (4,33).

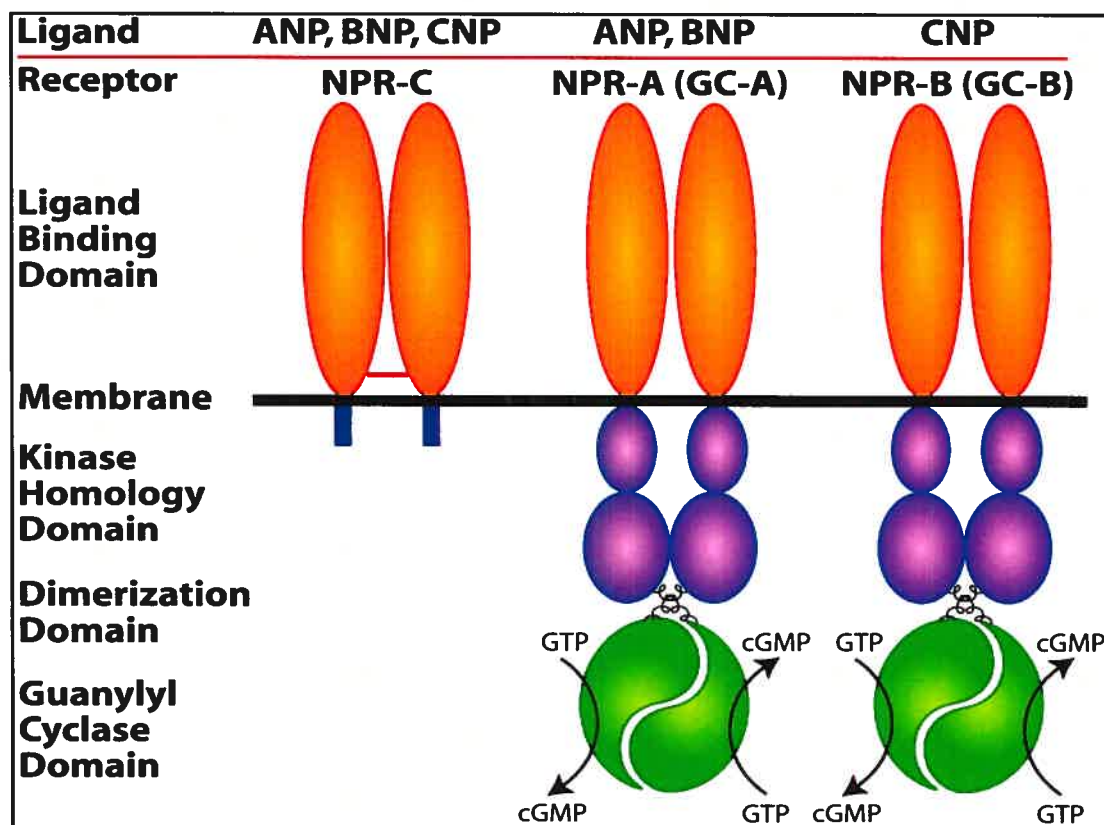


Figure 3. Structure des récepteurs des peptides natriurétiques

Abréviations : ANP, peptide natriurétique auriculaire; BNP, peptide natriurétique du cerveau; CNP, peptide natriurétique de type C; NPR-A/B/C, récepteurs des peptides natriurétiques de type A/B/C; GTP, guanosine triphosphate; GMPC, 3',5'-guanosine monophosphate cyclique; GC-A, guanylate cyclase A (synonyme de NPR-A); GC-B, guanylate cyclase B (synonyme de NPR-B).

Référence: Potter L., Abbey-Hosch S., Dickey D. Natriuretic peptides, their receptors and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocrine Reviews*. 2006; 27(1), p. 49

3.4.2- NPR-C

3.4.2.1- Structure, distribution, fonctions

Le NPR-C est un homodimère d'environ 130 kDa formé par un pont disulfure. Chaque monomère du récepteur possède un domaine transmembranaire formé par un segment

extracellulaire (440 acides aminés), un segment transmembranaire et un segment intracellulaire. Contrairement aux NPR-A et aux NPR-B, le domaine intracellulaire de ce récepteur est seulement formé de 37 acides aminés et ne possède pas d'activité guanylate cyclase intrinsèque (**Figure 3**). Le domaine extracellulaire de ce récepteur subit la *N*-glycosylation sur les résidus asparagine et partage 30% d'homologie avec les segments extracellulaires du NPR-A et du NPR-B (4). Tous les peptides natriurétiques peuvent se fixer au NPR-C, même si ce récepteur possède une meilleure affinité pour l'ANP et le CNP (33). Il existe aussi l'analogue synthétique de l'ANP, des[Gln¹⁸, Ser¹⁹, Gly²⁰, Leu²¹, Gly²²] ANP₄₋₂₃-amide C-ANP (C-ANP₄₋₂₃), qui est un peptide qui se lie spécifiquement et uniquement au NPR-C (40). Ce récepteur est exprimé dans les reins, le placenta, les oreillettes, le cerveau, les poumons, les glandes surrénales ainsi que dans les plaquettes, les cellules endothéliales et les CMLV (4). Comparativement aux autres récepteurs natriurétiques, le NPR-C est l'isoforme qui est principalement exprimée dans tous les tissus. La densité tissulaire de ces récepteurs est nettement supérieure à la densité des NPR-A et des NPR-B (41).

Deux types de NPR-C ont été récemment identifiés. Le premier homodimère du NPR-C est formé par des sous-unités de 67 kDa alors que le second est un homodimère constitué par des sous-unités de 77 kDa (42,43). Pour de nombreuses années, le NPR-C a été reconnu pour sa seule et unique fonction de clairance durant laquelle il régularise les niveaux plasmatiques de peptides natriurétiques via internalisation et dégradation lysosomale (40). Par contre, il a été récemment découvert que les deux sous-types du NPR-C sont des récepteurs avec des fonctions et des modes de régulations différentes. Le NPR-C formé par les sous-unités de 77 kDa régule explicitement la fonction de clairance (43) alors que, celui de 66 kDa est exclusivement couplé à l'inhibition de l'AC par l'intermédiaire des protéines Gi (44,45) et à l'activation de la PLC (46). Ces observations indiquent que le NPR-C n'est pas seulement un récepteur qui module la clairance des peptides natriurétiques mais une protéine qui est impliquée dans la signalisation d'une variété de réponses physiologiques telles que l'inhibition de la prolifération des CMLV et des cellules endothéliales, l'inhibition de la sécrétion de la progestérone par les cellules Leydig, régulation de la pression artérielle et du volume extracellulaire, inhibition *in vivo* de la sécrétion d'endothéline par les cellules

endothéliales aortiques, inhibition de la relâche de la thyroglobuline par les cellules humaines de la glande thyroïde, stimulation de la relâche de fluide et de protéines pancréatiques etc. (41,42,47).

3.4.2.2- Voie de signalisation du NPR-C

Le NPR-C exerce la majorité de ses fonctions physiologiques par l'intermédiaire de deux voies de signalisation importantes : la voie de l'adénylate cyclase et la voie de la PLC.

3.4.2.2.1- Voie de signalisation NPR-C/ AC

Il a été démontré que l'ANP peut inhiber l'activité de l'AC via les protéines Gi. De cette observation il a été conclu qu'un des récepteurs de l'ANP est couplé aux protéines Gi. Il a été par la suite découvert que parmi les trois récepteurs natriurétiques, seulement l'isoforme du NPR-C est couplée aux protéines Gi et que l'activation de ce complexe résulte en l'inhibition de l'AC et en conséquences, à la baisse de la production de l'AMPc (**Figure 4**). Le NPR-C n'est pas couplé aux protéines Gs, il ne peut donc pas activer l'AC mais seulement l'inhiber via son association exclusive aux protéines Gi. Ces observations ont donc révélé que le NPR-C exécute les fonctions physiologiques de l'ANP en modulant la production du messenger second de l'AMPc dans divers types de cellules et tissus (44,45).

Cette voie de signalisation est particulièrement importante pour le maintien d'une pression artérielle normale. L'AMPc en activant les PKA médie la vasorelaxation des vaisseaux, un phénomène essentiel pour le maintien d'une pression artérielle normale. Tous les facteurs ou les situations qui perturbent la production de l'AMPc deviennent néfastes pour l'homéostasie cardiovasculaire. Sachant que le NPR-C est couplé à la voie de l'inhibition de l'AC, toute élévation de l'expression ou de l'activité du NPR-C est susceptible d'entraîner la vasoconstriction des artères, la hausse de la pression artérielle et de provoquer conséquemment l'hypertension à long terme.

3.4.2.2.2- Voie de signalisation NPR-C/ PLC

La cascade de signalisation de la PLC est une voie activée par des récepteurs couplés à des protéines G, plus spécifiquement à la protéine Gq. Malgré que le NPR-C ne soit pas couplé à la protéine Gq, il a été toutefois démontré que la signalisation du NPR-C peut activer la PLC. Anand-Srivastava *et al.* ont démontré que l'inhibition de la production de l'AMPC induit par l'activation du NPR-C transactive la PLC et par conséquent, stimule la production d'IP₃ dans les CMLV (**Figure 4**). Ces observations illustrent que la voie de l'AC activée par le NPR-C exerce une interaction avec la voie de la PLC (48). Cette dernière génère deux seconds messagers : l'IP₃ et le DAG à partir d'un lipide membranaire, le phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate (PIP₂). L'IP₃ provoque la libération du calcium à partir des réserves du réticulum endoplasmique. L'augmentation brusque de la concentration cytoplasmique du calcium change la conformation de plusieurs protéines et active des kinases ainsi que des facteurs de transcription. Le DAG active les PKC, qui à son tour phosphorylent et modifient l'état fonctionnel de certaines protéines en présence de calcium (13).

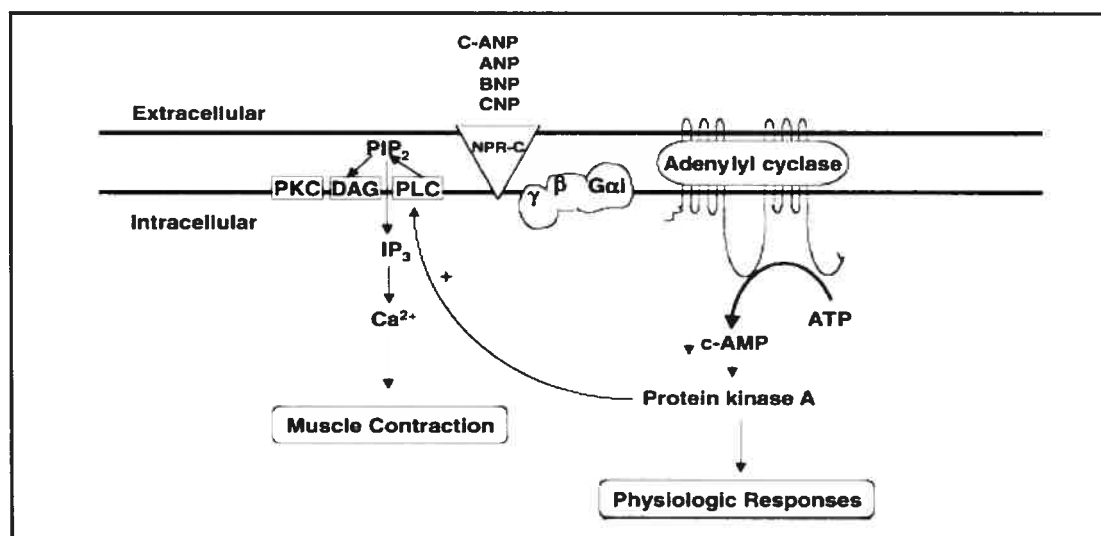


Figure 4. Voies principales de signalisation du récepteur natriurétique de type C

(NPR-C) Abréviations : ANP, peptide natriurétique auriculaire; BNP, peptide natriurétique du cerveau; CNP, peptide natriurétique de type C; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; ATP, adénosine triphosphate; PLC, phospholipase C; PKC, protéine kinase dépendante du calcium; DAG, diacylglycérol; IP₃, inositol 1,4,5 triphosphate; PIP₂, phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate.

Référence: Anand-Srivastava MB. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation, *Peptides*. 2005; **26**, p. 1050

3.4.2.2.3- NPR-C et autres voies de signalisation

Bien que les deux voies de signalisation principales du NPR-C soient celles de la PLC et de l'AC, il a été documenté que le NPR-C est aussi couplé à la voie des «*mitogen-activated protein kinases*» (MAPK). Prins *et al.* ont démontré que le C-ANP₄₋₂₃, un peptide sélectif qui se fixe uniquement au NPR-C, inhibe la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) des astrocytes en inhibant la voie des MAPK (49). Il a également été découvert que le C-ANP₄₋₂₃ inhibe l'activité des MAPK induite par l'endothéline-3 et par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) dans les astrocytes (49). Ces observations indiquent clairement que le NPR-C régule l'activité de la voie des MAPK et que ce récepteur est aussi couplé à cette voie de signalisation.

3.4.2.3- Régulation de l'expression et de la voie de signalisation du NPR-C

La régulation de la voie du NPR-C dépend respectivement de l'expression et de l'activité du NPR-C, des protéines Gi et de l'AC. Des changements au niveau d'un de ces paramètres par de diverses substances chimiques ou des hormones modifient la cascade de signalisation de ce récepteur. Le traitement des cellules endothéliales vasculaires avec du sel (NaCl) diminue par exemple la densité du NPR-C présente à la surface membranaire (50). L'angiotensine II diminue l'expression de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) du NPR-C dans les cellules musculaires lisses provenant d'aorte de rats (51). De plus, le traitement des CMLV à l'angiotensine II atténue l'inhibition de l'AC médié par le NPR-C en modulant négativement l'activité des protéines Gi (52). L'endothéline-1 et la vasopressine, deux hormones vasoconstrictrices, réduisent l'activité du NPR-C ainsi que l'expression des protéines Gi et du NPR-C (17,18). Les catécholamines réduisent l'expression du NPR-C alors que, le traitement des CMLV avec de l'ANP ou du C-ANP₄₋₂₃ réduit l'activité du NPR-C et l'expression des protéines Gi (53,54). Il a aussi été démontré que le facteur de croissance des fibroblastes et le PDGF diminuent l'expression de l'ARNm du NPR-C dans les cellules pulmonaires musculaires lisses (55). Par ailleurs, des agents chimiques comme la forskoline, le fluorure de sodium et l'AMP bromocyclique diminuent la densité des récepteurs NPR-C (56).

3.4.2.3.1- Interaction entre le NPR-A et le NPR-C

Une interaction entre les récepteurs NPR-A et NPR-C a déjà été documentée dans la littérature. La suppression du NPR-C dans les CMLV par les antisenses de ce récepteur engendre la stimulation de la production de la GMPc en réponse à l'ANP (57). De plus, les souris supprimées du gène NPR-C démontre une augmentation de l'excrétion de la GMPc dans l'urine (58). Ces deux exemples suggèrent la possibilité que l'inactivation du NPR-C induit la suractivation du NPR-A augmentant ainsi la production de la GMPc suite à la stimulation par l'ANP. Similairement, il a été observé que les souris déficient en NPR-A démontrent une augmentation de la pression artérielle (59). Il se pourrait que l'inhibition de l'activité du NPR-A augmente l'activité du NPR-C, induisant ainsi la hausse de l'inhibition de l'AC et par conséquent, l'augmentation de la pression artérielle.

3.4.2.4- Régulation du NPR-C dans les conditions pathologiques

Plusieurs études démontrent que l'activité ou l'expression du NPR-C peut être altérée dans divers états pathophysiologiques incluant l'hypertension. Des niveaux élevés d'ANP plasmatiques désensibilisent par exemple le NPR-C provenant de l'aorte de rats hypertendus DOCA-salt. (60). De plus, il a été observé que dans l'aorte et le coeur des rats hypertendus de type SHR et DOCA-salt, l'inhibition de l'AC médiée par le NPR-C est augmentée par rapport aux rats contrôles Wistar-Kyoto (WKY) (24,61). Ces observations peuvent être causées par une augmentation de l'expression ou de l'activité du NPR-C ou par la régulation positive des protéines Gi avec qui le NPR-C est associé. À cet effet, il a été démontré que l'aorte et le coeur des rats hypertendus SHR présentent une augmentation de l'expression des protéines $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ comparativement aux rats normotendus (61). Il se pourrait donc que la baisse de la production de l'AMPc observée chez les SHR soit causée par l'augmentation des protéines Gi et non par la modification du NPR-C. Cet exemple illustre clairement que la régulation de la voie de signalisation du NPR-C dépend à la fois du récepteur (NPR-C) et aussi des protéines transductrices (protéine Gi). Une diminution de la densité des NPR-C et de l'inhibition de l'AC est également observée dans les plaquettes des rats hypertendus de type SHR (62,63). Il a été également documenté que les aortes des rats traitées au L-NAME, un

analogue de la L-arginine qui bloque la production du monoxyde d'azote, démontrent une diminution de l'expression et de l'ARNm du NPR-C (64). L'angiotensine II (65), l'endothéline (17) et la noradrénaline (54), des hormones dont les taux plasmatiques sont élevés dans l'hypertension, régulent négativement le NPR-C. L'ensemble de ces études indiquent clairement que le NPR-C est régulé soit négativement ou soit positivement dans la pathogenèse de l'hypertension. Puisque le NPR-C est impliqué dans le développement et la progression de cette maladie, tout traitement axé sur la modulation de la voie du NPR-C pourrait être bénéfique pour contrer les problèmes reliés à l'hypertension.

4- MONOXYDE D'AZOTE

4.1- STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène diatomique formée d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés ensemble par une liaison double. Le NO possède un électron libre sur l'atome d'azote, ce qui le classe parmi le groupe de radicaux libres réactifs. Cette molécule peut générer des espèces réactives en réagissant avec l'oxygène, ou avec d'autres radicaux libres (66). Cependant, le NO est considéré comme un radical libre relativement stable (demi-vie : 2-30 secondes) comparativement à d'autres molécules réactives comme l'anion superoxyde ou l'anion hydroxyle (demi-vie : 10^{-9} à 10^{-10} secondes) (67,68).

Le NO est une molécule liposoluble à faible poids moléculaire, ce qui le permet de diffuser librement à travers la membrane plasmique de la cellule. La disponibilité du NO dans la cellule est limitée parce qu'il possède une demi-vie courte de quelques secondes et il réagit rapidement avec différents réactifs en générant des nouveaux produits. Le NO a une forte affinité pour des protéines contenant du fer, comme l'hémoglobine, la guanylate cyclase et il réagit également avec des acides nucléiques et des radicaux libres (66).

4.2- SYNTHASES DU MONOXYDE D'AZOTE

4.2.1- Structure et descriptions générales

Le NO est synthétisé par la NO synthase (NOS) qui transforme par une suite de réactions la L-arginine en L-citrulline et en NO. Pour catalyser cette réaction, la NOS a besoin non seulement de son substrat mais nécessite absolument la présence de cofacteurs, d'oxygène, de la calmoduline et de la nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH). La NOS est un dimère formé de deux monomères identiques. Chaque monomère est divisé en deux domaines : le domaine réductase situé en C-terminale du monomère et le domaine oxygénase situé en N-terminale (**Figure 5**). Le domaine réductase, section homologue au cytochrome P-450 réductase, comporte respectivement les sites de liaisons de la NADPH, de la calmoduline, de la flavine mononucléotide (FMN) et de la flavine adenine dinucléotide (FAD). Le domaine oxygénase contient les sites de liaison du substrat de la L-arginine, du groupement prosthétique hème, et de la (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine (BH₄) (69).

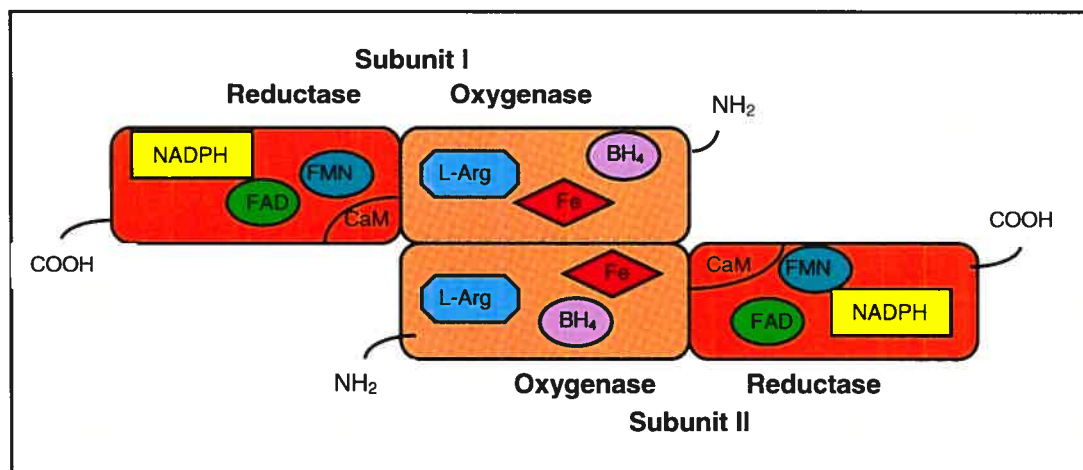


Figure 5. Structure de la synthase du monoxyde d'azote (NOS)

Abréviations : NADPH, nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydase; CaM, calmoduline; FMN, flavine mononucléotide; FAD, flavine adenine dinucléotide. L-Arg, L-arginine; Fe, groupement prosthétique hème; BH₄, (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine.

Inspirée de la référence: Andrew P., Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*. 1999; **43**, p. 522

4.2.2- Réaction catalytique de la NOS

La synthèse du NO implique deux étapes d'oxydation consécutives durant lesquelles un transfert d'électrons a lieu entre le domaine réductase et le domaine oxygénase. Le flux d'électrons se fait du domaine réductase du premier monomère vers le domaine oxygénase du second monomère et non entre le domaine réductase et oxygénase du même monomère (70). Ce mode de transfert d'électrons sous forme de «*cross-over*» est particulier et expliquerait la raison pourquoi la présence de la NOS dimérique est essentielle pour l'activité de cette enzyme. La NOS sous forme de monomère est inactive et ne peut pas produire du NO (69).

La première étape de la réaction consiste par l'hydroxylation du substrat L-arginine en N^{ω} -hydroxy-L-arginine et en second étape, la NOS oxyde la N^{ω} -hydroxy-L-arginine en L-citrulline et en NO (**Figure 6**). Durant ces étapes des électrons de la NADPH (domaine réductase) sont transférés aux groupements hème (domaine oxygénase) par l'intermédiaire des cofacteurs FAD et FMN dans la direction spécifique $NADPH \rightarrow FAD \rightarrow FMN \rightarrow$ hème. Par la suite, les électrons situés sur le groupement hème réduisent et activent la molécule d'oxygène enchaînant consécutivement les deux étapes d'oxydation de la L-arginine. La calmoduline joue un rôle prépondérant dans le cheminement des électrons entre les deux domaines des trois isoformes de la NOS (71-73).

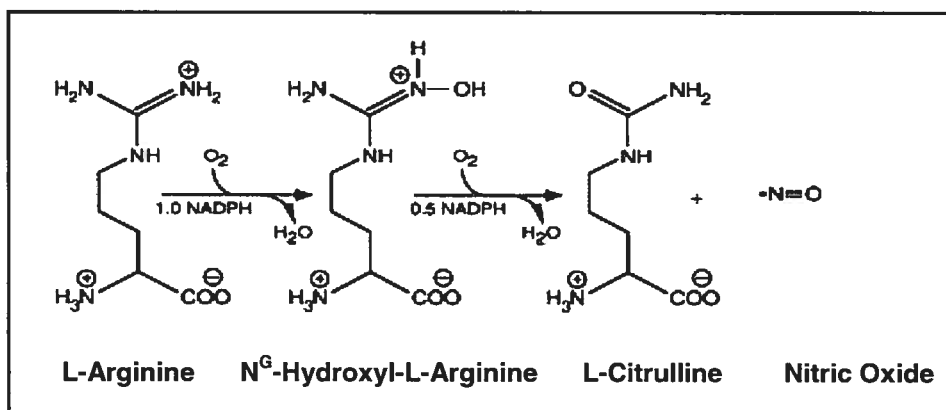


Figure 6. Réaction catalytique de la synthèse du monoxyde d'azote (NOS)

Abréviation: NADPH, nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydase.

Référence: Andrew P., Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases.

Cardiovascular Research. 1999; **43**, p. 522

4.2.3- Régulation de l'activité de la NOS

L'intégrité fonctionnelle de la NOS dépend de la présence et de la coordination d'un ensemble d'éléments. Tous changements infimes au niveau de la présence ou de la concentration des cofacteurs, du groupement hème, du substrat, de l'oxygène, de la calmoduline ou de la BH₄ entraînent des variations considérables dans l'activité normale de la NOS.

4.2.3.1- Rôle des flavines FAD et FMN dans l'activité de la NOS

Les cofacteurs FAD et FMN sont impliqués dans le transport des électrons de la NADPH au groupement hème. Cependant, en leur absence la NOS ne peut pas exécuter les réactions d'oxydation de la L-arginine (74).

4.2.3.2- Rôle de la calmoduline dans l'activité de la NOS

La calmoduline affecte le transfert et la vitesse du flux d'électrons entre la NADPH et les flavines ainsi qu'entre les domaines réductases et les domaines oxygénases de la NOS. La liaison de la calmoduline est nécessaire pour l'activité enzymatique maximale des trois isoformes de la NOS (74).

4.2.3.3- Rôle du groupement hème dans l'activité de la NOS

Le groupement hème est essentiel pour la dimérisation des monomères de la NOS. En absence de l'hème, cette enzyme existe sous forme de monomère. La NOS monomérique ne peut pas se lier à BH₄, engendrant ainsi l'arrêt de l'activité enzymatique de la NOS. De plus, l'hème contribue à l'interaction des domaines oxygénases et réductases dans la structure quaternaire de la protéine NOS (69).

4.2.3.4- Rôle de la BH₄ et de la L-arginine dans l'activité de la NOS

La BH₄ et la L-arginine sont impliqués dans la stabilisation et le bon fonctionnement de la NOS. Lors de la première étape de la réaction, la présence de la molécule BH₄ est primordiale sinon la réaction enzymatique est inhibée (74). En présence d'une haute concentration de BH₄ et de la L-arginine, la NOS produit exclusivement du NO par contre lorsque ces dernières sont absentes ou à basses concentrations, la NOS se

découple et produit non seulement du NO mais aussi de l'anion superoxyde. Une accumulation de cette molécule engendre la hausse du stress oxydatif, un phénomène souvent observé dans de nombreuses pathophysiologies comme l'hypertension. De plus, l'anion superoxyde généré par la NOS pourrait réagir avec le NO pour former le peroxyde d'azote et par conséquent, diminuer la biodisponibilité du NO. En présence d'une haute concentration de peroxyde d'azote, la forme active de la BH₄ est oxydée en forme inactive (BH₃) inhibant ainsi la production du NO par la NOS (69).

4.2.3.5- Inhibiteurs de la NOS

Il existe différentes catégories d'inhibiteurs de la NOS. Les principaux inhibiteurs sont des dérivés de la L-arginine, comme le N⁶-nitro-L-arginine méthyle ester (L-NAME) qui compétitionne pour le site de liaison du substrat et bloque la synthèse du NO par la NOS. Il existe aussi une classe d'inhibiteurs comme la diphenyliodonium, qui bloquent de façon irréversible la synthèse du NO en compétitionnant avec le site de liaison de la NADPH de la NOS. De plus, l'activité des isoformes constitutives de la NOS peut être inhibée par des composés qui bloquent le site de liaison de la calmoduline. De façon similaire, il existe des agents qui inhibent la synthèse de la BH₄ réduisant ainsi la disponibilité de ce cofacteur et qui par conséquent bloquent indirectement l'activité de la NOS. Par ailleurs, il a été démontré que le monoxyde de carbone et le bleu de méthylène sont des composés qui inhibent l'activité de la NOS en se liant directement au site de liaison du groupement hème (75).

4.2.4- Isoformes de la NOS

4.2.4.1- Descriptions générales

Il existe trois isoformes de la NOS : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inducible (iNOS). La eNOS et la nNOS sont des enzymes exprimées de façon constitutive. L'activité de la eNOS et de la nNOS est calcium/calmoduline dépendante c'est-à-dire, ces dernières sont inactives lorsque les niveaux intracellulaires de calcium sont bas. Suite à une élévation du niveau de calcium intracellulaire, la calmoduline se lie au calcium et la formation de ce complexe active les deux isoformes soient la eNOS et la nNOS. Ces dernières produisent et relâchent du NO pour des

courtes périodes de temps, jusqu'à ce que les niveaux intracellulaires de calcium diminuent. Par ailleurs, la iNOS est une isoforme inductible qui produit de très grande quantité de NO lorsque son expression est induite par les cytokines ou les agents inflammatoires. L'activité de la iNOS est indépendante du calcium quoique la calmoduline se lie irréversiblement à la iNOS même en absence du calcium (76). Il est toutefois documenté qu'en présence de calcium l'activité de la iNOS est stimulée davantage comparativement à l'activité de la iNOS en absence du calcium (71,76,77).

Les trois isoformes de la NOS sont encodées par trois gènes différents qui sont situés sur des chromosomes distincts (75). Même si la structure et le mode d'action des trois isoformes sont d'une grande homologie, ces trois enzymes se différencient par leurs spécificités de localisation, de régulation et de fonction (69).

4.2.4.2- eNOS

La eNOS est une protéine exprimée de façon constitutive dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (artères et veines). Bien que son expression est majoritairement dans les cellules endothéliales, la eNOS peut aussi être exprimée dans divers types de cellules et de tissus comme dans les cardiomyocytes, les cellules sanguines (plaquette, monocyte, neutrophile), les lymphocytes B et T, les fibroblastes de la peau etc (78). Le gène de la eNOS est situé sur le chromosome 7 et encode une protéine de 134 kDa (75). Cette enzyme existe sous deux formes : soluble et particulaire. Elle se retrouve minoritairement dans les compartiments cellulaires du noyau, du cytosquelette mais sa présence est surtout abondante dans la membrane plasmique cellulaire et dans l'appareil de Golgi (74). Il a été démontré que 50% de la totalité de la eNOS est liée à la membrane plasmique plus précisément liée aux cavéoles, des microdomaines riches en éléments de signalisation, alors que 35% seulement des eNOS sont localisées dans l'appareil de Golgi (69,79). Contrairement aux autres isoformes de la NOS, l'extrémité N-terminale du gène de la eNOS possède un site consensus pour la *N*-myristoylation (80). Cette isoforme subit par conséquent une myristoylation co-traductionnelle irréversible du résidu glycine (Gly-2) à l'extrémité N-terminale de la eNOS (81). Cette dernière est non seulement myristoylée mais subit également un changement post-traductionnelle réversible de la palmitoylation sur les résidus cystéine (Cys-15 et Cys-

26) localisés à l'extrémité N-terminale de la protéine (81). Le processus de la myristoylation permet l'association membranaire de la eNOS alors que la palmitoylation est responsable de la localisation spécifique de la eNOS aux cavéoles membranaires (81). Il a été démontré que la eNOS déficiente en myristoylation ne peut pas se lier à la membrane cellulaire et se distribue aléatoirement dans le cytosol (82). Puisque la palmitoylation est un changement réversible, il a été observé que la eNOS peut se dépalmitoyer en provoquant le transport rétrograde de la eNOS de la membrane cellulaire vers le Golgi (81). Ces observations démontrent que la distribution cellulaire (membranaire ou soluble) de la eNOS dépend des changements co/post-traductionnelles qu'elle subit (81).

L'activité de cette enzyme est physiologiquement importante car elle joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, en contribuant principalement à la vasodilatation des vaisseaux et à l'inhibition de la prolifération des CMLV. Il a été démontré que les souris «*knock-out*» du gène de la eNOS manifestent une élévation de la pression artérielle (83). L'expression et l'activité de la eNOS sont dépendantes des taux intracellulaires de calcium, par contre, cette enzyme peut aussi être régulée par divers stimuli physiques et molécules (78). L'augmentation des forces de cisaillement ainsi que l'exercice chronique sont des stimuli qui activent l'expression de cette enzyme (84). Les hormones tels que l'œstrogène, l'insuline, l'angiotensine II et l'endothéline ont augmentent tous l'expression de la eNOS (78). De plus, tous les agonistes des récepteurs dont la signalisation implique le calcium, tels que les catécholamines, l'acétylcholine, la bradykinine, la sérotonine, l'histamine, représentent des stimuli pour l'activité de la eNOS (85). L'ANP active également la eNOS par l'intermédiaire du NPR-C dans les cellules musculaires lisses gastro-intestinales (86). D'autre part, l'activité de la eNOS peut être inhibée par le NO : lorsque la eNOS demeure active pour de longues périodes de temps, le NO nitrosyle son enzyme entraînant l'inhibition de cette dernière par un mécanisme de rétro-action négative (78). En absence de calcium la eNOS membranaire se lie à deux protéines cavéolaires, cavéoline-1 dans les cellules endothéliales et cavéoline-3 dans les cardiomyocytes et cette association induit l'inhibition de l'activité de la eNOS (69).

4.2.4.3- nNOS

Le gène de la nNOS situé sur le chromosome 12 encode une protéine de 160 kDa (69). Cette protéine est constitutivement et principalement exprimée dans les neurones du système nerveux central et périphérique, dans les cardiomyocytes et le muscle squelettique (2,74). Cette isoenzyme est également exprimée dans le pancréas, l'estomac, les poumons et l'utérus (87). L'hypothalamus, l'hypophyse, le bulbe olfactif sont des régions du cerveau qui expriment la nNOS par contre, le cervelet est la région qui contient les niveaux les plus élevés de cette enzyme (88,89).

Contrairement aux autres isoformes de la NOS, l'extrémité N-terminale de la nNOS possède une séquence particulière de 220 acides aminés qui encode un domaine PDZ (81). L'activité de la nNOS dépend des concentrations intracellulaires de calcium. Cette isoforme ne subit aucunes modifications post/co-translationnelles. Les interactions protéines-protéines de la nNOS déterminent la localisation cellulaire de cette enzyme (90). Le domaine PDZ spécifique à la nNOS interagit avec PSD-95 et PSD93, des protéines neuronales qui permettent l'association de la nNOS à la membrane plasmique des neurones (74). En absence du domaine PDZ, la nNOS ne peut pas s'associer à la membrane plasmique neuronale et se distribue dans le cytosol, d'où l'importance du domaine PDZ pour la localisation membranaire de cette enzyme. Par ailleurs, dans le muscle squelettique, la nNOS se lie à la protéine α_1 -syntrophine pour permettre sa liaison avec la membrane plasmique (81). Comme pour la eNOS, en absence de calcium la nNOS interagit avec la cavéoline-3 dans le muscle squelettique, entraînant ainsi l'inhibition de l'activité de cette enzyme (76). Finalement, la nNOS peut également interagir avec la pompe calcique PM Ca^{2+} - ATPase4b au niveau des cavéoles de divers types cellulaires afin d'augmenter les niveaux cytosoliques de calcium (91).

4.2.4.4- iNOS

Cette isoenzyme de 130 kDa est encodée sur un gène situé sur le chromosome 17 (69). La séquence d'acides aminés de la iNOS partage respectivement une homologie de 51 à 54% à la eNOS et à la nNOS (75).

Contrairement aux NOS constitutives, l'activité de la iNOS n'est pas modulée par les niveaux de calcium. Par contre, la régulation de la iNOS se fait au niveau de sa transcription. Dans les conditions physiologiques la iNOS est une protéine qui est absente des cellules (92). Son expression est induite suite à une stimulation par des cytokines ou des agents inflammatoires dans une variété de cellules telles que, dans les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses et surtout dans les macrophages (69). Une fois activée, la iNOS produit de grande quantité de NO pour de longues périodes de temps (66). L'inhibition de la iNOS est médiée par la relâche de cytokines inhibitrices comme la TGF β (93). La iNOS n'a aucun site de myristoylation et n'exprime pas de domaine PDZ à l'extrémité N-terminale. Par contre, il a été démontré qu'une portion de la totalité des iNOS est palmitoylée et que ce changement permet d'acheminer la iNOS à la membrane plasmique de la cellule (94). Cette enzyme peut également se retrouver dans le noyau, dans l'appareil de Golgi et les mitochondries (81). Il a été observé que l'association des iNOS membranaires avec les cavéolines diminue la stabilité de l'enzyme et par conséquent inhibe l'activité enzymatique de cette protéine (95). De plus, l'induction de l'expression de la iNOS est accompagnée par une baisse des niveaux protéiques des cavéolines (96).

4.3- VOIE DE MÉTABOLISME ET D'ÉLIMINATION DU NO

Le NO libéré par les différentes NOS est métabolisé puis il est éliminé de l'organisme. Ce gaz est principalement évacué du corps sous forme de nitrate (NO $_3^-$) qui est un produit du métabolisme du NO. La transformation du NO en nitrate se fait dans les globules rouges du sang via deux mécanismes impliquant l'hémoglobine. La voie d'élimination principale du NO passe par les reins. Ces derniers éliminent dans l'urine en moyenne 0.3-2 mM de nitrate par jour (97). Bien que le NO soit essentiellement

éliminé par les reins, des études récentes proposent qu'une petite quantité du NO puisse aussi être évacuée hors de l'organisme par l'intermédiaire des poumons lors de l'expiration respiratoire (1).

4.4- VOIES DE SIGNALISATION DU NO

Le NO exerce l'ensemble de ces fonctions physiologiques par l'intermédiaire de deux grandes voies de signalisation : la voie de signalisation dépendante de la GMPc et la voie indépendante de la GMPc.

4.4.1- Voie de signalisation dépendante de la GMPc

Cette voie de signalisation est la voie classique par laquelle NO médie la majorité de ces fonctions biologiques. La GMPc est un messager second produit par la guanylate cyclase. Cette dernière existe sous deux formes : la guanylate cyclase soluble (GCs) et la guanylate cyclase particulaire (membranaire). Il a été démontré que le NO se lie seulement à la GCs. Cette dernière est une enzyme qui est localisée dans le cytosol de plusieurs types de cellules. Elle est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . La coexpression de chaque sous-unité est essentielle pour l'activité catalytique de cette enzyme. Chaque sous-unité de la GCs est divisée en trois domaines : domaine régulateur (extrémité N-terminale), domaine de dimérisation (partie centrale) et domaine catalytique (extrémité C-terminale) (**Figure 7**). À l'extrémité N-terminale de la sous-unité β se trouve un groupement hème prosthétique avec un noyau penta-coordonné ferreux (Fe^{2+}) (98). Ce noyau ferreux est associé à la portion protéique de la GCs par l'intermédiaire d'un groupe axiale imidazole de l'histidine 105 (99). L'interaction du NO avec le noyau de fer brise le lien entre l'histidine-105 et le fer et ceci résulte à la formation d'un complexe penta-coordonné nitrosyl-hème. La formation de ce dernier provoque un changement conformationnel de la GCs qui par conséquent aboutit à l'activation de cette enzyme. Une fois activée, la GCs catalyse la conversion du GTP en GMPc (98).

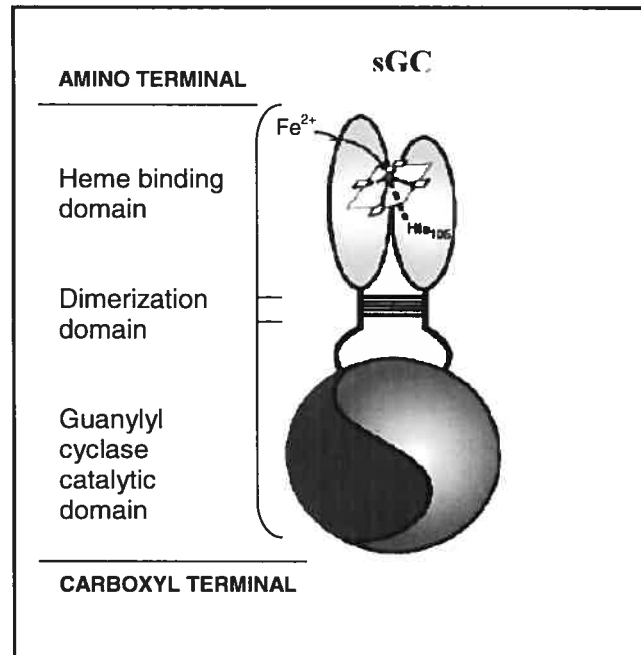


Figure 7. Structure de la guanylate cyclase soluble (GCs)

Abréviation: His105, Histidine 105

Référence: Lucas K., Pitari G., Kazerounian S., Stewart IR. *et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*. 2000; **52**, p. 381

La GMPc régule l'activité d'une variété de protéines et enzymes tels que les canaux ioniques voltage-dépendent, les phosphodiésterases dépendantes de la GMPc et les PKG. Les phosphodiésterases sont des enzymes qui régulent la concentration intracellulaire de la GMPc et qui hydrolysent la GMPc en 5'-guanosine monophosphate (GMP). Ces enzymes contrôlent donc la durée et l'amplitude de cette voie de signalisation (98).

Le principal médiateur de la signalisation de la GMPc est la PKG. Cette dernière catalyse le transfert d'un phosphate à partir de l'ATP sur un résidu sérine ou thréonine de plusieurs protéines régulatrices. L'activation des PKG par le NO entraîne la transformation d'un stimulus extracellulaire en réponse cellulaire physiologique. Dans les CMLV l'activation de la PKG par le NO, plus spécifiquement de la PKG I, entraîne l'activation ou l'inhibition de divers canaux calciques et potassiques ainsi que la déphosphorylation des chaînes de myosines légères (**Figure 8**) (39). L'ensemble de ces

réactions cause la diminution des niveaux intracellulaires de calcium et conséquemment médie la vasorelaxation.

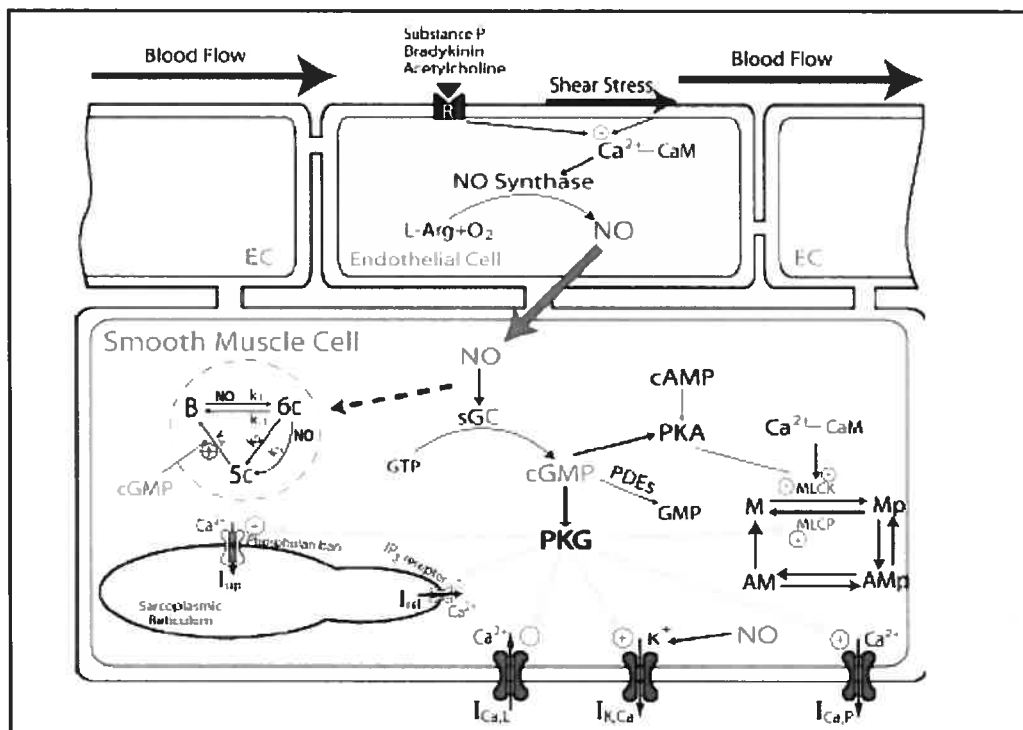


Figure 8. Mécanismes de vasorelaxation induite par la voie 3', 5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc) du monoxyde d'azote (NO)

Abréviations : sGC, guanylate cyclase soluble; GTP, guanosine triphosphate; cAMP, adénosine monophosphate cyclique; PKA, protéine kinase dépendante de l'AMPc; PKG, protéine kinase dépendante de la GMPc; GMP, guanosine monophosphate; CaM, calmoduline; M, chaîne de myosine légères; PDE, phosphodiesterase; MLCP, myosin light chain phosphatase; MLCK, myosin light chain kinase; I_{up} , sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake current; I_{rel} , sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release current, I_{KCa} , KCa channel current; $I_{Ca,L}$, L-type Ca^{2+} channel current, $I_{Ca,P}$, sarcolemma Ca^{2+} -ATPase pump.

Référence: Yang J., Clark J., Bryann R., Robertson C. Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell. *AJP- Heart and Circulatory Physiology*. 2005; **289**, p. 887

4.4.2- Voie de signalisation indépendante de la GMPc

Bien que la voie de signalisation principale du NO soit celle de la GMPc, il existe aussi la voie de signalisation indépendante de la GMPc, qui repose sur la production de molécules réactives comme le peroxy-nitrite (ONOO^-) et le dioxyde de nitrogène ($^{\bullet}\text{NO}_2$). Le peroxy-nitrite est une molécule formée par la réaction du NO et de l'anion superoxyde alors que, le dioxyde de nitrogène provient de la réaction du peroxy-nitrite avec des métaux de transition (100).

Les mécanismes indépendants de la GMPc du NO regroupent respectivement deux types de réactions différentes : la *S*-nitrosylation et la nitration. La *S*-nitrosylation est un processus post-traductionnel réversible qui consiste à transférer une molécule de NO sur des métaux de transition ou sur un groupement thiol d'un résidu cystéine d'une protéine (101). La nitrosylation affecte la fonction et l'activité des facteurs de transcription, des enzymes, des récepteurs membranaires et des canaux ioniques (102). D'autre part la nitration est une modification post-traductionnelle irréversible qui consiste par l'addition d'un groupe nitro (NO_2) sur un résidu tyrosine ou tryptophane d'une protéine (100). Les lipides et les protéines sont des cibles de la nitration. Le résultat de cette réaction amène soit à l'inhibition ou soit à l'activation des protéines par contre, les cas d'inhibition sont les plus souvent observés (103). En conditions physiologiques, les protéines comme la chaîne lourde de la myosine, l' α -actinine et la prostacycline synthase, subissent un taux de nitration basal dans divers types cellulaires tels que dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les CMLV (104). Ces niveaux basals de nitration permettent de médier des cascades de signalisation physiologique. Néanmoins, lorsque les protéines subissent des taux de nitrosylation ou nitration aberrants, ceux-ci peuvent contribuer au développement de plusieurs conditions pathophysiologiques (101, 104). Il a été démontré par exemple que chez les rats hypertendus le niveau de nitration sur les résidus tyrosine des protéines est élevé comparativement aux rats normotendus (105).

4.5- FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DU NO

Le NO est impliqué dans un ensemble de processus physiologiques dans le système cardiovasculaire, le système immunitaire et le système nerveux. En présence de

stimulus, le NO active une cascade de signalisation cellulaire par deux mécanismes d'action : les mécanismes d'action rapide et les mécanismes d'action lente. Les mécanismes d'action lente du NO nécessitent des heures avant d'engendrer une réponse cellulaire alors que, les mécanismes d'action rapide du NO se produisent en dedans de quelques secondes ou minutes (106).

4.5.1- Fonctions dans le système cardiovasculaire

Dans le système cardiovasculaire, le NO joue un rôle dans la prolifération des CMLV, dans l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire, le maintien du tonus vasculaire, la régulation des canaux ioniques et surtout dans la régulation de la pression artérielle (66,107). Le NO est un puissant vasodilatateur qui exerce un effet prépondérant dans le maintien de la balance de la pression artérielle en contrôlant les phénomènes de vasorelaxation et de vasoconstriction. Une surproduction du NO résulte dans la vasorelaxation et une baisse de la pression artérielle alors qu'une déficience dans la production du NO engendre la vasoconstriction et donc une augmentation de la pression artérielle. Parmi l'ensemble des isoformes la eNOS est celle qui exerce majoritairement les fonctions au niveau cardiovasculaire (69). Le NO produit par la eNOS diffuse des cellules endothéliales vers les CMLV où il se lie à la GCs et active la production du messenger second de la GMPc. Cette dernière active la PKG I qui stimule par la suite une variété d'effecteurs pour diminuer les niveaux intracellulaires de calcium. Cette baisse du calcium entraîne à son tour la vasorelaxation et par conséquent, le maintien de la pression artérielle normale (**Figure 8**).

4.5.2- Fonctions dans le système immunitaire

Le NO formé par la iNOS est impliqué dans les réponses du système immunitaire de l'organisme. Il tue ou inhibe la croissance d'une variété de pathogènes comme les bactéries (108), les champignons (109) et les parasites (110). Le NO tue aussi les cellules cancéreuses (111) et possède la capacité de bloquer la réplication virale (112). Le mécanisme précis par lequel NO tue les cellules n'est pas encore entièrement élucidé. Néanmoins, plusieurs hypothèses sont élaborées : le NO pourrait inhiber la synthèse de l'ADN des cellules cancéreuses en inactivant l'enzyme ribonucléotide réductase (113)

ou endommager directement l'ADN par une réaction de désamination (114). Le NO bloque également le cycle de Krebs, la glycolyse et la phosphorylation oxydative (66). Bref, l'ensemble de ces phénomènes aboutit à la mort cellulaire.

4.5.3- Fonctions dans le système nerveux

Le NO généré par la nNOS est impliqué dans les fonctions de neuroprotection, du flux sanguin mais peut aussi être impliqué dans le phénomène de neurotoxicité. Le NO joue un rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central et périphérique (66). La substance P représente un stimulus qui induit la production du NO (39). Le glutamate est également un stimulus qui active la relâche du NO par les neurones pré-synaptiques (66). Le NO diffuse ensuite dans les neurones post-synaptiques environnants où il stimule la production de la GMPc qui lui, augmente le flux sanguin neuronal (66). Par contre il a été démontré que dans certaines formes de paralysie, des niveaux élevés de glutamate engendrent la relâche de très grande quantité de NO qui contribue à la toxicité cellulaire (115).

4.6- FONCTIONS PATHOLOGIQUES DU NO

Toute comme une production insuffisante du NO est dangereuse, la production excessive de cette molécule est toute aussi néfaste. Le maintien d'un équilibre entre la production et l'élimination du NO est essentiel pour maintenir l'homéostasie physiologique. Tout changement au niveau de la production du NO provoque un déséquilibre qui aboutit à des effets désastreux pour la survie cellulaire. La production excessive du NO conduit à la mort et à la toxicité cellulaire ou tissulaire ainsi qu'à la hausse du stress oxydatif.

Des hauts niveaux du NO peuvent inhiber l'angiogénèse des cellules endothéliales, induire l'apoptose de divers types cellulaires et augmenter la neurotoxicité (66,116,117). Le NO peut également se lier à l'anion superoxyde pour former des molécules comme le peroxyde d'hydrogène et par conséquent, augmenter le pool des radicaux libres. Une augmentation de ces derniers provoque la hausse du stress oxydatif cellulaire. Lorsque les anti-oxydants cellulaires n'arrivent plus à contrer la hausse des

concentrations des radicaux libres, le déséquilibre du niveau du stress oxydatif conduit à l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires (5). Par conséquent, ces réactions amènent la mort cellulaire, la modulation négative de l'activité et de la fonction des enzymes et des protéines ainsi que la modification de la stabilité des structures protéiques et lipidiques (118). L'ensemble de ces effets néfastes contribue de façon significative à la genèse de diverses maladies au niveau des différents systèmes physiologiques, incluant dans le système cardiovasculaire.

4.7- DYSFONCTIONNEMENT ENDOTHÉLIAL ET HYPERTENSION

Le dysfonctionnement endothélial est défini par l'altération réversible de la fonction des cellules endothéliales, qui est accompagnée par une diminution de la production du NO et une augmentation de la production d'anion superoxyde (5). L'inhibition ou la régulation négative de l'activité spécifique de la eNOS représente la source de la baisse de la production du NO et de la hausse d'anion superoxyde. En d'autres termes, le dysfonctionnement endothélial prend naissance du dysfonctionnement de la eNOS (5).

Le dysfonctionnement endothélial se manifeste dans de nombreuses pathophysiologies comme dans l'athérosclérose (119), le diabète (120) et l'hypertension (121). En effet, dans le modèle de rats SHR, un modèle analogue à l'hypertension essentielle humaine, les symptômes clés d'un dysfonctionnement endothélial sont observés : une baisse de la biodisponibilité du NO et une hausse de la génération d'anion superoxyde (122). Puisque le NO est un vasodilatateur puissant, la baisse de ce dernier entraîne la hausse de la pression artérielle dans l'organisme. De plus, il a été démontré que dans les conditions d'altération de la fonction endothéliale tel que dans le modèle SHR, les niveaux d'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, sont augmentés (5,123). Cette observation suggère que dans les conditions de dysfonctionnement endothélial, la pression artérielle est non seulement augmentée par le manque du NO mais que cette hausse de la pression artérielle est accentuée par les niveaux élevés d'angiotensine II (124). En revanche, l'accumulation de l'anion superoxyde entraîne pour sa part une hausse dramatique du stress oxydatif et par conséquent, induit des dommages néfastes pour le système cardiovasculaire (5).

En résumé, l'effet cumulatif de la baisse du NO, de la hausse de l'anion superoxyde et de l'angiotensine II observé dans le dysfonctionnement endothélial pourrait représenter une des causes favorisant la pathologie de l'hypertension.

4.8- TRAITEMENTS THÉRAPEUTIQUES DU NO

Les nitrates organiques sont longtemps prescrits en tant que vasodilatateurs en milieu clinique pour traiter les angines de poitrine et l'hypertension. Les nitrates sont des molécules métabolisées enzymatiquement pour générer du NO. En plus de la famille des nitrates, des traitements d'inhalation de basse concentration de NO sont prescrits pour traiter les cas d'hypertension pulmonaire, l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire et le syndrome de troubles respiratoires. L'inhalation du NO est une méthode de traitement plus privilégiée par rapport aux nitrates car elle permet une relâche et une action plus rapide du NO et ne nécessite aucune dégradation enzymatique du composé (66,125).

De nos jours, la recherche pharmaceutique est axé sur la découverte d'agents pharmacologiques qui peuvent altérer soit négativement ou soit positivement l'activité de la NOS (126). Dans les conditions de dysfonctionnement endothéliale ou de production excessive du NO, ces agents seraient bénéfiques car ils pourraient activer ou inhiber l'action des NOS et donc produire ou arrêter la production du NO. L'administration des cofacteurs ou du substrat de la NOS serait un moyen potentiel pour traiter une déficience en production du NO. Dans les situations d'une production excessive du NO l'administration de l'arginase, enzyme qui dégrade l'arginine plasmatique, permettrait de diminuer la biodisponibilité du substrat de la NOS et éventuellement arrêter la production du NO. Néanmoins, la difficulté réside à trouver des molécules qui inhibent ou activent spécifiquement chaque isoforme de la NOS et non l'ensemble des NOS. De plus, il faut assurer que les nouvelles drogues potentielles ne causent pas des effets secondaires dangereux pour les autres systèmes physiologiques (125,126). En résumé, l'utilisation thérapeutique du NO représente un horizon bénéfique pour traiter ou diminuer l'avancement de certaines maladies.

5- VOIE DE SIGNALISATION DES MAPK

5.1- DESCRIPTIONS GÉNÉRALES

La cascade de signalisation des MAPK est activée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires, particulièrement par les facteurs de croissance. L'activation de cette voie est déclenchée par les récepteurs à tyrosine kinase et par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. Cette voie fait intervenir un grand nombre d'étapes entre la membrane et le noyau et permet de réguler la fonction d'une variété de protéines comme les facteurs de transcription, les protéines nucléaires et cytoplasmiques. Les MAPK transforment les signaux extracellulaires en réponse intracellulaire et sont impliqués dans les phénomènes de l'apoptose, de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire. La cascade d'activation des MAPK consiste en trois étapes de phosphorylation consécutives impliquant trois grandes familles de protéines cytoplasmiques : les MAPK kinase kinase (MAPKKK), les MAPK kinase (MAPKK ou MEK) et les MAPK. Les MAPKKK activent les MEK en phosphorylant sur des résidus sérine ou thréonine spécifiques. Les MEK activent et phosphorylent à leur tour les MAPK sur des résidus spécifiques de tyrosine et de thréonine. L'inhibition de l'activité des MAPK se fait par l'intermédiaire des phosphatases qui déphosphorylent les résidus tyrosine et thréonine des MAPK (127,128).

5.2- ACTIVATION DE LA VOIE DES MAPK

5.2.1- Activation par les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs tyrosine kinase sont des protéines à un seul segment transmembranaire avec un domaine intracytoplasmique doué d'une activité enzymatique tyrosine kinase intrinsèque. La liaison des facteurs de croissance aux récepteurs à activité tyrosine kinase provoque leur dimérisation et leur autophosphorylation, ce qui entraîne la stimulation de l'activité kinase de ces récepteurs. Chaque sous-unité du récepteur phosphoryle l'autre sous-unité, sur plusieurs résidus tyrosine présents dans le domaine intracellulaire. Les tyrosines phosphorylées servent de sites de reconnaissance pour de

nombreuses protéines adaptatrices comme Shc, Grb2 et Sos qui mènent à l'activation des protéines Ras. Ces derniers sont des petites protéines G liant le GTP. Lorsque Ras est couplé au GDP elle est inactive par contre, par interaction aux complexes protéiques adaptatrices, Ras s'active par échange du GDP en GTP. Sous forme liant le GTP, Ras interagit avec différents effecteurs telle la MAPKKK. Une fois activée, cette dernière active en phosphorylant la MEK sur des résidus sérine ou thréonine. Il existe différentes isoformes de MEK par contre, seules les MEK spécifiques au signal extracellulaire sont activées. Les MEK phosphorylent et activent à leur tour les MAPK, qui sont alors transportées dans le noyau où elles phosphorylent certains facteurs de transcriptions (129,130).

5.2.2- Activation par les récepteurs couplés aux protéines G

Autres que les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs couplés aux protéines G peuvent également activer la voie des MAPK. Certains récepteurs couplés aux protéines Gq, Gi ou Gs, comme les récepteurs à l'angiotensine ou aux catécholamines, empruntent diverses voies faisant intervenir différentes protéines pour réguler par action directe ou indirecte les trois membres classiques, MAPKKK, MEK et MAPK, de la voie des MAPK. Parmi les divers mécanismes impliqués dans l'activation des MAPK, les récepteurs couplés aux protéines Gs sont ceux qui régulent principalement l'activité des MAPK par l'intermédiaire de l'AMPc et des PKA. Dans certains types de cellules, les PKA peuvent directement inhiber ou activer la phosphorylation de MEK-1 sans l'intervention de Ras. Par ailleurs, les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines Gq et Gi peuvent réguler les MAPK par des mécanismes distincts faisant intervenir l'activation de diverses protéines adaptatrices ou enzymes comme Src, Shc et la PI3-kinase. L'activation de ces derniers par les protéines G renforce l'activation de la cascade de phosphorylation de Ras et subséquemment de tous les membres de la voie MAPK. Dernièrement, la sous-unité α de la protéine Gq, via sa voie de signalisation de la PLC et de la PKC, active la voie de la MAPK en stimulant directement ou indirectement la protéine MAPKKK (131,132).

5.3- ISOFORMES DES MAPK

Les MAPK sont constituées de plusieurs familles. Parmi l'ensemble, «*extracellular signal-regulated kinase 1/2*» (ERK1/2), «*c-Jun N-terminal kinase*» (JNK), «*p38 stress-activated kinase*» (p38) et «*extracellular signal-regulated kinase 5*» (ERK5) sont les mieux caractérisées et étudiées. En état inactif, toutes les isoformes sont situées dans le cytosol et sont transportées dans le noyau une fois activées. Ainsi, les MAPK servent de relais entre les événements cytoplasmiques et nucléaires. L'activation de toutes les isoformes des MAPK nécessite absolument la phosphorylation sur deux résidus : une tyrosine et un thréonine. La phosphorylation sur seulement un résidu n'active pas ces enzymes. De plus, un «*cross-talk*» existe entre les trois isoformes des MAPK. Certains facteurs de transcriptions et protéines peuvent par exemple être phosphorylés par plus qu'une isoforme de MAPK. De la même façon, les MEK spécifiques à l'isoforme de p38 peuvent par exemple être activées par les MAPKKK de JNK et vice versa (127-129).

5.3.1- ERK1/2

Cette famille des MAPK est composée de deux isoformes, ERK 1 et ERK 2, et est souvent référée par ERK1/2. Ces deux protéines ont respectivement un poids moléculaire de 44 et 42 kDa et possède 85% d'homologie entre elles (128). Elles sont exprimées de façon ubiquitaire et assurent principalement les fonctions de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire (128). Elles jouent aussi un rôle prépondérant dans le cycle cellulaire, plus précisément, entre les phase G1 et S (133). L'activation de ERK1/2 est initiée par les MAPKKK de type Raf ou Mos et subséquemment par les MEK 1 et 2 (**Figure 9**) (134). Cette cascade de signalisation peut être activée par une variété de stimuli comme par le facteur de croissance épidermal (EGF) et le PDGF, par les peptides vasoactifs d'angiotensine II, d'endothéline et par l'insuline (135). Une fois activée, ERK1/2 phosphorylent les résidus sérine ou thréonine qui se trouvent à proximité des résidus prolines (séquence consensus Pro-Leu-Ser/Thr-Pro) de plusieurs types de substrats incluant des protéines nucléaires, des protéines cytosoliques et des facteurs de transcription tels que Elk1, c-Myc, la polymérase d'ARN

II, la kinase S6 ribosomale et la phospholipase A2 cytosolique (128,136). Les ERK1/2 peuvent également stimuler la transcription des gènes c-Fos et c-Jun, entraînant ainsi la production des facteurs de transcription Fos et Jun (128). La déphosphorylation et par conséquent l'inhibition de l'activité de ERK1/2 se fait par l'intermédiaire des phosphatases sélectives de type 1, 3 et 4 (137-139). La présence de ERK1/2, plus précisément de ERK2, est essentielle pour la formation du mésoderme au stade embryonnaire (140). Les gènes des souris supprimés de ERK1 et MEK2 se développent normalement alors que, les souris n'exprimant pas ERK2 et MEK1 démontrent des problèmes lors du développement du placenta (141-143).

5.3.2- JNK

JNK, aussi connue sous la nomenclature de JNK/SAPK, est une famille de protéines de 46 et 54 kDa qui comporte trois isoformes, JNK1, JNK2 et JNK3, encodées par trois gènes différents (129). Chaque gène subit un épissage alternatif entraînant plusieurs copies différentes du même isoforme : JNK1 existe par exemple sous quatre isoformes différentes, JNK1a1, JNK1a2, JNK1b1 et JNK1b2 (128). Les JNK1 et JNK2 sont exprimées de façon ubiquitaire alors que, JNK3 est majoritairement exprimée dans le cerveau et le cœur (129). Les JNK1, JNK2 et JNK3 sont identiques à 85% et sont activées par les lipopolysaccharides, la radiation ultraviolette, le stress oxydatif, les cytokines et l'hyperosmolarité (144). La cascade d'activation de JNK est principalement initiée par MAPKKK 1 et 4 et ensuite par les MEK4 et MEK7 (**Figure 9**) (129). Une fois activée, JNK a comme cible nucléaire des facteurs de transcription ou des gènes comme Elk-1, c-Jun, AP-1, ATF2 (129). Cette voie de signalisation est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules T, dans la production d'interleukine-2 mais surtout, dans le phénomène de l'apoptose (129). Les trois isoformes de JNK sont inhibées par la phosphatase 1 (145). La voie de signalisation de JNK est importante pour la pré-implantation du blastocyste durant le développement embryonnaire des mammifères (146). De plus, la signalisation de JNK est impliquée dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2 (147). Les souris double «*knock-out*» des gènes JNK1/ JNK3 et des gènes JNK2/ JNK3 survivent et se développent

normalement. Néanmoins, les souris double «*knock-out*» des gènes JNK1/ JNK2 meurent au cours du stade embryonnaire dû à des malformations neuronales (148).

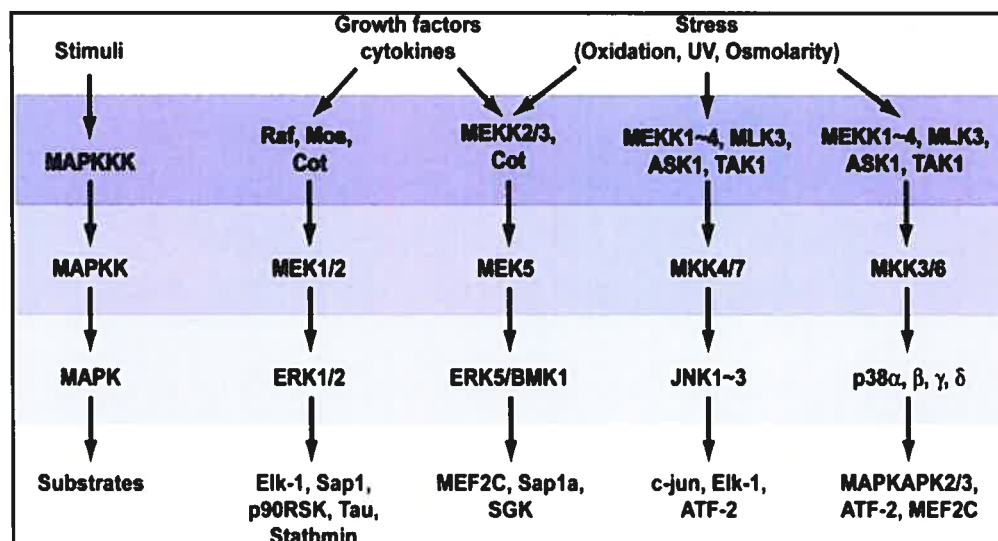


Figure 9. Voie d'activation des différentes isoformes des «mitogen-activated protein kinases»² (MAPK)

Abréviations: MAPKKK, MAPK kinase kinase; MAPKK ou MEK, MAPK kinase; ERK1/2, «extracellular signal-regulated kinase 1/2»; JNK, «c-Jun N-terminal kinase»; p38, «p38 stress-activated kinase»; ERK5, «extracellular signal-regulated kinase 5»; BMK1, «Big MAPK-1».

Références: Imajo M., Tsuchiya Y., Nishida E. Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB Life*. 2006; **58** (5-6), p. 313

5.3.3- p38

La famille de p38 est composée de cinq isoformes : p38 α , p38 β , p38 β 2, p38 γ et p38 δ (144). L'expression de ces isoformes varie en fonction du type cellulaire ou tissulaire. La p38 α est majoritairement exprimée dans les leucocytes et dans la moelle épinière. La p38 β est exprimée dans le cerveau et le cœur, alors que la p38 γ se retrouve dans le muscle squelettique (129). Les isoformes de cette famille peuvent être activées par le stress oxydatif et osmotique, par l'exposition à l'ultraviolet et en réponse aux toxines et agents inflammatoires (128). La cascade d'activation de p38 est majoritairement initiée par les MAPKKK de type AK-1 et TAK-1 (129). Les MEK 3 et MEK 6 activent les

² Tous les noms mentionnés dans la figure 9 ne sont pas tous cités dans le texte.

p38, plus spécifiquement, MEK 3 phosphoryle surtout les isoformes p38 α et p38 β alors que, MEK 6 phosphoryle toutes les isoformes de la p38 (**Figure 9**) (149). Les substrats de la p38 sont des facteurs de transcription comme ATF-2, Elk et SP-1 ainsi que des protéines nommées «*MAP-kinase-activated protein kinase-2*» et «*MAP-kinase-activated protein kinase-3*» (129). La voie de signalisation de la p38 est principalement impliquée dans l'apoptose et dans la production de cytokines et de chemokines comme l'interleukine-1,6 et 8 (129). Toute comme la voie de JNK, la p38 est également impliquée dans la pré-implantation du blastocyste au cours du développement embryonnaire des mammifères (146).

5.3.4- ERK5

ERK5, anciennement connue sous le nom de «*Big MAPK-1*», est l'isoforme des MAPK qui est le plus récemment caractérisée et étudiée. Cette isoforme est exprimée de façon ubiquitaire et comparativement à ERK1/2, elle possède un segment additionnel de 400 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique (128). À l'état inactif ERK5 se localise dans le cytosol par contre, dans certains types cellulaires comme dans les cellules COS7, HeLa et Rat1, ERK5 peut également se retrouver dans le noyau même en absence de stimulation (134). L'activation de ERK5 est seulement initiée par les MAPKKK 2 et 3 et subséquentement par MEK 5 (**Figure 9**) (150,151). Cette dernière est très spécifique à ERK5 et ne phosphoryle aucune autre isoforme des MAPK. De plus, MEK5 ne peut pas s'activer par les MAPKKK de la voie de signalisation de ERK1/2 (152). ERK5 est activée par le stress oxydatif, l'hyperosmolarité et par le facteur de croissance neural, l'EGF ainsi que par le sérum (128). Les fonctions physiologiques de la cascade de signalisation de ERK5 ne sont pas encore entièrement détaillées, néanmoins il a été observé qu'une fois activée, ERK5 joue un rôle dans la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, l'inhibition *in vitro* de l'apoptose des cellules endothéliales et la différenciation neuronale (134). ERK5 phosphoryle les facteurs de transcription comme le «*myocyte enhancer factor 2C*», Sap1a, c-Myc et stimule la transcription des gènes c-Fos et c-Jun. Bien que ERK1/2 et ERK5 ont des substrats en commun, il a été démontré que ces deux isoformes ont des rôles *in vivo* différents (134). Dans les cellules cardiaques ERK5 et ERK1/2 sont contrôlées différemment et de façon

indépendante (153). L'expression de ERK5 est primordiale dans le développement cardiovasculaire et de la différenciation neuronale au stade embryonnaire et adulte des souris (127). Plus spécifiquement, la voie de signalisation de ERK5 contribue à l'angiogénèse au cours de la vie embryonnaire. Les souris «*knock-out*» du gène ERK5 meurent au jour 10 du stade foetal à cause de complications cardiovasculaires (154).

5.4- MAPK ET PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

La balance entre l'activation et l'inactivation des MAPK est cruciale pour la production de réponses cellulaires spécifiques. Néanmoins, toute activation excessive ou inappropriée de la cascade de signalisation des MAPK est impliquée dans le développement ou la progression de plusieurs pathologies comme l'hypertension, le diabète et l'athérosclérose. Des peptides vasoactifs tels que l'angiotensine II et l'endothéline-1, peuvent réguler la voie des MAPK. À cet effet, il a été démontré que l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, stimule l'activation des MAPK entraînant l'hyperplasie et l'hypertrophie des CMLV provenant des artères humaines (118,155). De plus, l'activation de la voie des MAPK par l'angiotensine II et l'endothéline-1, est impliquée dans la progression des complications vasculaires de la pathologie de l'hypertension (156). La modulation des MAPK par l'ANP et le NO, deux vasodilatateurs, a aussi été démontrée dans les cellules musculaires lisses. Contrairement à l'angiotensine II, l'ANP inhibe l'activation des MAPK en réponse à la stimulation du PDGF dans les astrocytes (49). D'autre part, le NO altère soit positivement ou négativement l'activité des MAPK dépendamment du type de cellules. Par exemple dans les CMLV, NO diminue l'activité de ERK1/2, un effet qui est bénéfique pour contrer les complications liées à la prolifération cellulaire des pathologies vasculaires (49).

6- OBJECTIFS

Une relation entre le NPR-A et le NPR-C a été documenté dans la littérature (57,59). La suppression du NPR-C par les antisenses de ce récepteur résulte dans la stimulation de la production de la GMPc en réponse à l'ANP, un phénomène qui pourrait être dû à la suractivation du NPR-A (57). Par ailleurs, la suppression du NPR-A par les antisenses du NPR-A entraîne l'augmentation de l'expression du NPR-C dans les CMLV (résultats non publiés). Puisque l'activation du NPR-A stimule la production de la GMPc et que le NPR-A régule l'expression du NPR-C, il est probable que le NPR-A module le NPR-C via la voie de la GMPc. Sachant que le NO est un activateur de la production de la GMPc, il se pourrait également que le NO puisse mimer l'action de la GMPc et altérer l'expression et la signalisation AC du NPR-C. De plus, les études récentes de notre laboratoire ont démontré que le traitement des rats avec du L-NAME, un inhibiteur de la NOS, engendre l'augmentation de la pression artérielle, de l'expression des protéines $G_{i\alpha}$ et induit l'atténuation de l'inhibition de l'AC stimulée par le NPR-C dans les cœurs de rats (157). Il n'est toutefois pas connu si l'atténuation observée dans les rats L-NAME est attribuable à la diminution de l'expression de la protéine NPR-C. L'objectif de cette étude consiste à évaluer l'effet du NO sur l'expression et l'activité du NPR-C dans les CMLV. Si le NO régule cette protéine, le second but de ce projet sera de déterminer le mécanisme d'action par lequel NO régule le NPR-C et sa voie de signalisation au niveau cellulaire. Afin d'examiner ces objectifs, des CMLV provenant de la culture primaire des aortes de rats ainsi qu'une lignée de CMLV clonale provenant des aortes thoraciques de rats embryonnaires (CMLV de type A10) seront utilisées. Les CMLV de type A10 seront traitées avec du *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), un donneur de NO, pour diverses périodes de temps et l'expression des protéines NPR-C, $G_{i\alpha-2}$ et $G_{i\alpha-3}$ sera déterminée par immunobuvardage de type Western. L'effet du NO sur l'activité de l'AC sera également examiné dans les CMLV de type A10. En second lieu, pour vérifier si le NO régule le NPR-C par un mécanisme GMPc-dépendant ou -indépendant, les CMLV de type A10 seront incubées avec du SNAP en absence ou en présence d'ODQ, un inhibiteur de la GCs, de KT5823, un inhibiteur de la PKG et de MnTBAP, un neutraliseur de la molécule du peroxy-nitrite, et l'expression du NPR-C sera ensuite évaluée. Finalement, si les résultats montrent que le NO agit par un mécanisme indépendant de la GMPc, l'effet du NO sur le degré de phosphorylation des MAPK sera examiné dans les CMLV par la méthode d'immunobuvardage de type Western.

CHAPITRE 2

***NITRIC OXIDE MODULATES THE EXPRESSION AND SIGNALING OF
NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR C IN AORTIC VASCULAR SMOOTH
MUSCLE CELLS ****

Maria Arejian, Yuan Li, Madhu B. Anand-Srivastava

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

Faculty of Medicine, University of Montreal

Soumis à Journal of Hypertension

Short title: NPR-C modulation by nitric oxide

Author responsible for correspondence and requests for reprints:

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava, Ph.D.

Professor

Department of Physiology

Faculty of Medicine

University of Montreal

C.P. 6128, Succ. Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada

H3C 3J7

Tel: (514) 343-2091

Fax: (514) 343-2111

Email: 

Word count: 5426 (without figure legends); 6228 (entire document)

* This study was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research (MOP 13661).

ABSTRACT

Objective. We have recently shown that the inhibition of NO synthase by *N*⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) attenuates natriuretic peptide receptor C (NPR-C)-mediated inhibition of adenylyl cyclase, however, whether this attenuation is attributed to the decrease in NPR-C expression is not known. The present studies were undertaken to examine if NO could modulate the expression of NPR-C and associated adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods.** Rat aortic VSMC and A10 VSMC from rat embryonic thoracic aorta were treated with *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP), a NO donor, at different time periods and the levels of NPR-C, Gi α -2, Gi α -3 and mitogen-activated protein kinases (MAPK) were determined by Western Blotting using specific antibodies. Adenylyl cyclase activity was determined by measuring [³²P]cAMP formation from [α -³²P]ATP. **Results.** Treatment of aortic VSMC and A10 VSMC with SNAP decreased the expression of NPR-C, Gi α -2 and Gi α -3 proteins in a time-dependant manner. The maximal inhibition was between 25-30%. The decreased expression of Gi α proteins was observed at 6 h, whereas, the decrease in NPR-C protein expression was observed at 2 h. The decreased expression of NPR-C protein at 2 h when the levels of Gi α were not altered was not reflected in NPR-C-mediated attenuation of adenylyl cyclase activity. However, at 24 h, when the levels of both NPR-C and Gi α were decreased, NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase by C-ANP₄₋₂₃ was completely abolished. Furthermore, ODQ, an inhibitor of soluble guanylyl cylase, and KT5823, an inhibitor of protein kinase G, were unable to restore the SNAP-induced decreased expression of NPR-C protein to control levels. In addition, MnTBAP, a scavenger of peroxynitrite, was unable to restore to control levels the SNAP-induced decreased expression of NPR-C protein. SNAP also decreased the activation status of MAPK such as p-ERK1/2, p-JNK and p-p38 in VSMC, which were not restored to control levels by ODQ, KT5823 and MnTBAP. **Conclusion.** These results indicate that NO decreases NPR-C protein expression by cGMP-independent mechanisms and that the decreased expression of NPR-C and Gi proteins by NO follows a temporal relationship. It could thus be suggested that NO-induced downregulation of NPR-C and Gi proteins that result in an augmentation of cAMP levels may be an additional mechanism through which NO regulates blood pressure.

INTRODUCTION

Natriuretic peptides (NP) are a family of three peptide hormones termed atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP), all of which are produced in mammalian hearts, including human (1). ANP regulates a variety of physiological parameters, including blood pressure (2) by interacting with receptors on plasma membrane either to generate second messengers such as cyclic AMP (cAMP) (3-5), cyclic GMP (cGMP) (6,7) or to affect ion channels (2). Three types of natriuretic peptide receptors (NPR) have been cloned; NPR-A (8) and NPR-B (9) subtypes are membrane bound guanylate cyclases (130-180 kDa) that mediate biological actions of NP through regulation of intracellular cGMP levels (2), whereas NPR-C (10,11) is a disulfide-bridged homodimer of 67 kDa and 77 kDa subunits with a broad range of ligands including ANP, BNP, CNP and des[Gln¹⁸, Ser¹⁹, Gly²⁰, Leu²¹, Gly²²] ANP₄₋₂₃-amide C-ANP (C-ANP₄₋₂₃) which does not show any affinity for NPR-A and NPR-B (12,13). The 77 kDa subunit of NPR-C is involved in NP internalization and thus serves as a clearance receptor (12,13), while the 67 kDa subunit is coupled to adenylyl cyclase inhibition through inhibitory guanine nucleotide regulatory protein (Gi) (10,14) or to activation of phospholipase C (15).

The adenylyl cyclase/cAMP signal transduction system is implicated in the regulation of cardiovascular functions and is composed of three components: receptor, catalytic subunit and guanine nucleotide regulatory protein (G protein). The stimulatory and inhibitory responses of the hormones on adenylyl cyclase are mediated by stimulatory (Gs) and Gi proteins, respectively (16). G proteins exist as heterodimers of α , β , γ subunits and the specificity of G proteins is attributed to α - subunit. Molecular cloning has revealed four different forms of Gs α resulting from the differential splicing of one gene (17) and three distinct forms of Gi α : Gi α -1, Gi α -2, Gi α -3 encoded by three different genes (18). All three isoforms of Gi α are implicated in the regulation of adenylyl cyclase inhibition (18). The NPR-C and associated Gi protein-adenylyl cyclase signaling has been reported to be regulated by various vasoactive peptides such as

angiotensin II, ANP, endothelin and arginine-vasopressin, as well as nitric oxide (NO) (19-23).

NO is a diffusible universal messenger that acts as an important biological signaling molecule in diverse physiological processes, including vasorelaxation (24). Both NO and NP function as vasodilators by activation of the guanylate cyclase/cGMP pathway (25). NO stimulates soluble guanylyl cyclase (sGC) while NP activate membrane-bound particulate guanylyl cyclase of NPR-A/NPR-B and increase cGMP levels (25). NO has also been shown to act by cGMP-independent mechanisms, including through activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) (24,26). We have recently shown that the inhibition of NO synthase by *N*⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) attenuates the NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase however, whether this attenuation is attributed to the decrease in NPR-C expression is not known. We therefore undertook the present studies to investigate the modulation of NPR-C by NO in vascular smooth muscle cells (VSMC).

We have provided the first evidence that NO decreases the expression of NPR-C protein by a cGMP-independent mechanism and that the decreased expression of NPR-C by NO precedes the attenuated expression of Gi proteins. The modulation of NPR-C and Gi proteins and associated signaling by NO may thus play an important role in the regulation of blood pressure.

MATERIALS

[α -³²P]ATP was purchased from GE HealthCare BioSciences (Montreal, Quebec). Des[Gln¹⁸, Ser¹⁹, Gly²⁰, Leu²¹, Gly²²] ANP₄₋₂₃-amide C-ANP (C-ANP₄₋₂₃) was from Bachem Laboratories (USA). Mn(111)tetralis (benzoic acid porphyrin) (MnTBAP) and KT5823 were purchased from Cedarlane Laboratories (Hornby, Ontario). Antibodies directed against NPR-C (N-20), Gi α -2 (L-5), Gi α -3 (C-10), p-ERK (E-4) (against phosphorylated Tyr-204 of ERK1/2), total ERK (C-14), p-JNK (D-8) (against phosphorylated Thr-183 & Tyr-185), total JNK (C-20), p-p38 (G-7) (against phosphorylated Tyr-182), total P38 (F-3), dynein (74-1) and Western blotting reagents were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri).

METHODS

Cell culture and incubation

Rat aortic VSMC were cultured as described previously (27). A-10 cell line (A10 VSMC) from rat embryonic thoracic aorta was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville). The cells were plated in 75 cm² flasks or in 100 mm plates and were incubated at 37°C in 95% air and 5% CO₂ humidified atmosphere in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (with glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate) containing 1% antibiotics and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). VSMC and A10 cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin containing 0.2% EDTA (VSMC were used between passages 4 and 10). Confluent cells were starved by incubation for 3 or 24h in DMEM without FBS at 37°C to reduce the interference by growth factors present in the serum. These cells were then incubated in the presence or absence of ODQ (20 μ M), KT5823 (1 μ M) and MnTBAP (20 μ M) 2 hours prior to SNAP (100 μ M) treatment. After incubation for different time periods at 37°C, cells were lysed with lysis buffer (25 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 25 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Na orthovanadate, 10 mmol/L

Na fluoride, 10 mmol/L Na pyrophosphate, 2 mmol/L benzamidine, 2 mmol/L ethylenebis(oxyethylenenitrolo)-tetraacetic acid, 2 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 0.5 µg/mL leupeptin) or were homogenized in a Dounce homogenizer (Wheaton, Millville). The homogenate was collected by centrifugation at 4°C for 10 minutes at 2800 RPM and resuspended in Tris-EDTA homogenizing buffer (TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.5)) and was used for adenylyl cyclase assay. On the other hand, cell lysates were centrifuged at 12 000 RPM for 10 minutes at 4°C and were used for immunoblotting studies. Cell viability was checked with the trypan blue exclusion technique.

Adenylyl cyclase activity determination

Adenylyl cyclase activity was determined by measuring [³²P]cAMP formation from [α -³²P]ATP as described previously (10,14). Typical assay medium contained 50 mmol/L glycylglycine, pH 7.5, 0.5 mmol/L MgATP, [α -³²P]ATP (1.5×10^6 cpm), 5 mmol/L MgCl₂ (in excess of ATP concentration), 100 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L cAMP, 0.1 mmol/L EGTA, 10 µmol/L GTP γ S, 1 mmol/L 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and an ATP-regenerating system consisting of 2 mmol/L creatine phosphate, 0.1 mg creatine kinase/ml and 0.1 mg of myokinase/ml in a final volume of 200 µL. Incubations were initiated by the addition of the membrane preparations (20-30 µg) to the reaction mixture, which had been thermally equilibrated for 2 min at 37°C. The reactions conducted in triplicate for 10 min at 37°C were terminated by the addition of 0.6 mL of 120 mmol/L zinc acetate containing 0.5 mmol/L unlabeled cAMP. cAMP was purified by coprecipitation of other nucleotides with ZnCO₃ by addition of 0.5 mL of 144 mmol/L Na₂CO₃ and subsequent chromatography by the double column system. The unlabeled cAMP served to monitor the recovery of the [³²P]cAMP by measuring absorbance at 259 nm. Under the assay conditions used, adenylyl cyclase activity was linear with respect to protein concentrations and time of incubation. Protein concentration was determined using the Bradford method with bovine serum albumin as standard.

Western blotting

Western blotting of Gi proteins, NPR-C, and MAPK was performed as described previously (23,28,29). After sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad; Ontario, Canada) with semidry transblot apparatus (Bio-Rad). The proteins on the membranes were stained with Ponceau S to confirm that equivalent amount of proteins were loaded into each well. The membranes were then blocked for 1 h at room temperature in PBS containing 5% dehydrated milk and 0.2% Tween 20 and were then incubated with antibodies directed against NPR-C (N-20), Gi α -2 (L-5), Gi α -3 (C-10), p-ERK (E-4) (against phosphorylated Tyr-204 of ERK1/2), total ERK (C-14), p-JNK (D-8) (against phosphorylated Thr-183 & Tyr-185), total JNK (C-20), p-p38 (G-7) (against phosphorylated Tyr-182), total P38 (F-3) and dynein (74-1) (used as control for protein loading), overnight at 4°C. The antibody-antigen complexes were detected by incubating the membranes with horseradish peroxidase-conjugated antibodies for 1 h at room temperature. The blots were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) Western-blotting detection reagents from Santa Cruz. The autoradiograms were quantified by densitometric scanning using an enhanced laser densitometer (LKB Ultrason XL, Pharmacia, QC, Canada) and the gel scan evaluation software (version 2.1) from Pharmacia. The scanning was one dimensional and scanned the entire area of protein bands in autoradiograms.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM. Comparisons between groups were made with analysis of variance (ANOVA) in conjunction with the Newman-Keuls test or either using Student's *t* test for unpaired samples. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of SNAP treatment on NPR-C protein levels in A10 VSMC

We have earlier shown that the inhibition of NO synthase by N^6 -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) attenuates the NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase however, whether this attenuation is attributed to the decrease in NPR-C expression is not known. In order to investigate if NO could also modulate the expression of NPR-C protein, we treated A10 VSMC with 100 μ M SNAP for different time periods and the levels of NPR-C protein were determined by immunoblotting using specific antibody directed against NPR-C protein. The results shown in Fig. 1 indicate that the levels of NPR-C protein were significantly attenuated in treated cells by about 40 ± 1 % after 2 h of SNAP treatment and remained decreased until 24 h of treatment.

Effect of SNAP treatment on NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase

To investigate if the decreased levels of NPR-C by SNAP treatment were reflected in NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase, the effect of SNAP treatment was examined on C-ANP₄₋₂₃-mediated inhibition of adenylyl cyclase in A10 VSMC. The results shown in Fig. 2 indicate that C-ANP₄₋₂₃ that interacts specifically with NPR-C, inhibited adenylyl cyclase activity in a concentration-dependent manner in control cells, with a maximal inhibition of about 35%. However, the treatment of cells with SNAP for 2 h (short term) did not alter the extent of inhibition of adenylyl cyclase by C-ANP₄₋₂₃, whereas longer treatment of cells (24 h) with SNAP completely attenuated the C-ANP₄₋₂₃-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity.

Time-Course of SNAP treatment on Gi protein levels in A10 VSMC

We have earlier shown that treatment of A10 VSMC with SNAP for 24 h decreased the levels of Gi α -2 and Gi α -3 proteins (23); however, the temporal relationship between the effect of SNAP and Gi α protein expression was not investigated. Therefore, it was of interest to examine if the short term treatment of A10 VSMC with SNAP also decreases the expression of Gi α proteins. To test this, the effect

of SNAP on $\text{Gi}\alpha$ protein expression at different time of treatment was investigated. The results shown in Fig. 3 indicate that the levels of $\text{Gi}\alpha$ -2 (Fig. 3A) and $\text{Gi}\alpha$ -3 (Fig. 3B) were not altered at 2 h of treatment with SNAP, but started decreasing at 6 h and a decrease of about 30-35% was observed at 24 h of treatment, as determined by densitometric scanning.

Effect of ODO, KT5823 and MnTBAP on SNAP-induced decreased expression of NPR-C

Since NO has been shown to act by cGMP-dependent and -independent pathways (24), it was of interest to examine if NO-induced decreased expression of NPR-C protein is mediated through cGMP pathway or involves some other mechanisms. To test this, we examined the effect of ODO, an inhibitor of sGC, on the expression of NPR-C protein in control and SNAP-treated A10 VSMC. The results shown in Fig. 4A indicate that ODO inhibited NPR-C protein expression by 10% and was unable to reverse the SNAP-induced decreased levels of NPR-C to control levels.

To further confirm our finding, we tested the effect of KT5823, a protein kinase G (PKG) inhibitor, on the SNAP-induced decreased expression of NPR-C protein in A10 VSMC. The result shown in Fig. 4B indicates that KT5823, like ODO, was also unable to restore the SNAP-induced decreased level of NPR-C. These data strongly suggest that NO-induced decreased expression of NPR-C protein occurs through a cGMP-independent mechanism.

NO has been reported to form peroxynitrite (ONOO^-) by its interaction with superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$) in VSMC (30). To investigate if NO-induced decreased level of NPR-C protein was attributed to the formation of peroxynitrite, we investigated the effect of MnTBAP, a scavenger of peroxynitrite and superoxide dismutase mimetic agent, on SNAP-induced decreased level of NPR-C protein in A10 VSMC. The results shown in Fig. 4C reveal that MnTBAP did not restore the SNAP-induced decreased expression of NPR-C protein toward control levels, suggesting that peroxynitrite was not responsible for the NO-mediated decreased expression of NPR-C protein.

Effect of SNAP, ODQ and KT5823 treatments on MAPK activity in VSMC

NO has been shown to regulate MAPK activity by cGMP-dependant and -independent mechanisms (31,32). In order to investigate if SNAP could modulate the MAPK activation in VSMC, we examined the effect of SNAP on the phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 in VSMC. The results shown in Fig. 5 illustrate that the control cells exhibited basal levels of phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 5A), JNK (Fig. 5B) and p38 (Fig. 5C) which were inhibited by SNAP treatment by about $30 \pm 3\%$.

Since SNAP-induced downregulation of NPR-C is mediated by a cGMP-independent mechanism, it was of interest to examine if SNAP-induced decreased activation of MAPK is also mediated by cGMP-independant mechanism. To test this possibility, the effect of ODQ and KT5823 on the phosphorylation of MAPK in control and SNAP-treated VSMC was examined. The results shown in Fig. 5 indicate that ODQ was unable to reverse the SNAP-induced decreased phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 5A), JNK (Fig. 5B) and p38 (Fig. 5C). In addition, KT5823 was also unable to restore the SNAP-induced decreased phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 5A), JNK (Fig. 5B) and p38 (Fig. 5C). These data suggest that NO-mediated decreased activation of the MAPK occurs through a cGMP-independent mechanism.

Effect of MnTBAP on SNAP-induced decreased activation of MAPK

To further investigate if peroxynitrite was responsible for the NO-induced decreased phosphorylation of MAPK, we investigated the effect of MnTBAP on SNAP-induced decreased phosphorylation of different MAPK in VSMC. The results shown in Fig. 6 illustrate that MnTBAP treatment did not restore the SNAP-induced decreased phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 6A), JNK (Fig. 6B) and p38 (Fig. 6C) toward control levels, suggesting that NO-induced decreased activation of MAPK was not attributed to the formation of peroxynitrite.

DISCUSSION

We have recently shown that the exposure of VSMC to SNAP for a long period of time (24 h) decreased the expression of NPR-C, $G_i\alpha$ -2 and $G_i\alpha$ -3 proteins as well as associated functions (23). In the present studies, we demonstrate for the first time that short term treatment of A10 VSMC with SNAP for 2 h decreased the expression of NPR-C, whereas NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase was not affected. However, longer treatment of cells with SNAP resulted in the attenuation of NPR-C expression as well as NPR-C-mediated adenylyl cyclase inhibition. Our results are in accordance with previous studies showing that treatment of A10 VSMC with SNAP for 24 h decreased the expression of NPR-C protein as well as NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity by C-ANP₄₋₂₃ (23). However, our results are in contrast to the *in vivo* studies reporting that rats treated with L-NAME for 4 weeks, an inhibitor of NO synthase that results in the decreased levels of NO, exhibited decreased expression of NPR-C mRNA in thoracic aorta as well as attenuation of NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in rat hearts (28,33). The apparent discrepancies may be attributed to the differences in the method and type of treatment, i.e. *in vivo* study (rats) vs. *in vitro* study (VSMC), acute treatment vs. chronic treatment. It may be possible that the downregulation of NPR-C mRNA and NPR-C associated functions in L-NAME hypertensive rats may be due to the influence of the renin angiotensin system, because treatment of L-NAME hypertensive rats with losartan, an AT₁ receptor antagonist was able to completely restore the attenuated NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase to control levels (34).

Our results showing that the decreased expression of NPR-C protein by short term treatment with SNAP preceded the attenuated expression of $G_i\alpha$ proteins in A10 VSMC are quite intriguing and suggest that NPR-C-mediated decreased levels of cAMP may be responsible for the decreases in $G_i\alpha$ protein expression. In this regard, a chronic exposure of adipocytes with adenosine agonist N⁶-phenylisopropyladenosine that interacts with inhibitory adenosine receptor (A1) and inhibits adenylyl cyclase activity and cAMP levels has also been reported to decrease the levels of $G_i\alpha$ proteins (35). In

addition, isoprenaline that stimulates adenylyl cyclase activity and cAMP levels has been shown to augment the levels of $G_i\alpha$ proteins (36).

Our results showed that NO-induced decreased expression of NPR-C and $G_i\alpha$ protein was also reflected in decreased inhibition of adenylyl cyclase by NPR-C activation by C-ANP₄₋₂₃ after 24 h of treatment. However, a correlation between the decreased levels of NPR-C protein and decreased NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase did not exist at 2 h of SNAP treatment, which may be due to the possibility that at this time, the levels of $G_i\alpha$ protein that couple NPR-C to adenylyl cyclase were not altered. Thus, it appears that decrease in NPR-C only without alteration in the other components may not solely be responsible for the attenuation of NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase. This notion is supported by our results showing that a complete attenuation of C-ANP₄₋₂₃-mediated inhibition of adenylyl cyclase after 24 h of SNAP treatment was associated with decreased levels of both $G_i\alpha$ and NPR-C proteins. These results are in accordance with our previous studies showing that treatment of VSMC with C-ANP₄₋₂₃ for 24 h that resulted in complete attenuation of NPR-C-mediated inhibition of adenylyl cyclase was attributed to the cumulative effect of both decreased levels of $G_i\alpha$ proteins and decreased NPR-C density (19).

Our results showing that NO-induced decreased expression of NPR-C protein was not blocked by ODQ, an inhibitor of sGC and KT5823, an inhibitor of protein kinase G, suggest that NO-induced decreased expression of NPR-C protein was not mediated through a cGMP-dependent mechanism and may involve some other mechanisms. In this regard, increasing evidence indicate that NO regulates a variety of physiological functions in a cGMP-independent mechanism, including apoptosis and growth inhibition in vascular and endothelial cells (37). In addition, peroxynitrite which is formed by the interaction of NO and superoxide anion (38) did not appear to be implicated in NO-induced decreased expression of NPR-C, because MnTBAP, a scavenger of peroxynitrite and superoxide dismutase mimetic agent, did not restore the expression of NPR-C toward control levels.

We have also demonstrated that NO decreased the phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 MAPK in VSMC following 24 h of treatment. Our results are in agreement with other studies showing that NO inhibited the activation of ERK1/2, JNK and p38 in rat VSMC, mouse macrophage-like cell line and rat alveolar macrophages (39-41). However, our results are in contrast with the studies of other investigators who have shown that NO stimulated the phosphorylation of different MAPK in various cell types and methodology (time of treatment, choice of NO donor drugs) (31,32,42). The apparent discrepancies may be attributed to the differences in cell type used in the different studies. It should also be noted that NO-induced decreased expression of NPR-C and Gi proteins as well as decreased MAPK activation may not be attributed to apoptosis, because cell viability checked by trypan blue exclusion technique indicated that >90-95% cells were viable following 24 h treatment with SNAP.

We have also shown that NO-induced decreased activation of ERK1/2, JNK and p38 occurs through a cGMP-independent mechanism because ODQ and KT5823 were unable to reverse the NO-induced decreased phosphorylation of different MAPK. These results are supported by other studies showing that NO modulated the activation of ERK1/2, JNK and p38 by cGMP-dependent or -independent mechanisms (32,39,42). In addition, our results demonstrating that NO-induced decreased activation of ERK1/2, JNK and p38 proteins was not due to the formation of peroxynitrite are in contrast to the studies of other investigators who have reported that peroxynitrite activates the phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 in various cell types (43,44). The apparent discrepancies may be attributed to the differences in the cell type or to the type of treatment, i.e. exogenous peroxynitrite treatment vs. endogenous production of peroxynitrite.

Taken together, we have shown that NO decreases the expression of NPR-C, Gi proteins and MAPK activation through a cGMP-independent pathway. It may be possible that NO-evoked decreased activation of MAPK may be responsible for the decreased expression of NPR-C and Gi proteins. In this regard, we have previously shown the involvement of MAPK signaling pathway in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi α -2 and Gi α -3 proteins in VSMC (45). However, whether NO inhibits

MAPK activation by targeting the Ras/Raf-1 signaling activity or by directly targeting the MAPK is not clear and needs to be investigated. Thus, it may be suggested that NO-induced inhibition of NPR-C and $G_i\alpha$ protein expression and resultant increased levels of cAMP as well as decreased activation of MAPK signaling may be the potential pathway through which NO elicits its vasorelaxant and antiproliferative effects and thereby regulates blood pressure (Fig. 7).

In conclusion, we have shown that exposure of VSMC to SNAP decreased the expression of NPR-C and $G_i\alpha$ proteins and the activation of MAPK. The decreased expression of NPR-C by SNAP preceded the attenuated expression of $G_i\alpha$ proteins. The decreased levels of NPR-C and $G_i\alpha$ proteins at 24 h were reflected in decreased NPR-C-mediated adenylyl cyclase inhibition. It may thus be suggested that the NO-induced downregulation of NPR-C and G_i protein that result in an augmentation of cAMP levels may be an additional mechanism through which NO regulates blood pressure.

REFERENCE LIST

1. Levin ER., Gardner DG., Sawson WK. Natriuretic peptides, *N Engl J Med.* 1998; **339**, p. 321-328
2. Anand-Srivastava MB, Trachte GJ. Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms, *Pharmacol Rev.* 1993; **45**, p. 455-497
3. Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, Genest J. Atrial natriuretic factor inhibits adenylyl cyclase activity, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1984; **121**, p. 855-862
4. Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, Genest J. Atrial natriuretic factor inhibits adenylyl cyclase activity, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1985; **121**, p. 855-862
5. Anand-Srivastava MB, Vinay P, Genest J, Cantin M. Effect of atrial natriuretic factor on adenylyl cyclase in various nephron segments, *Am J Physiol.* 1986; **251**, p. F417-F423
6. Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Garcia R, Thibault C, Gutkowska J. Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1984; p. 515-527
7. Waldman S, Rapport RM, Murad F. Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylyl cyclase and elevates cGMP in rat tissues, *J Biol Chem.* 1984; **259**, p. 15332-15334
8. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin H, Goeddel DV, Schultz S. A membrane form of guanylyl cyclase is an atrial natriuretic peptide receptors, *Nature.* 1989; **338** (78), p. 83
9. Chang M, Lowe DG, Lewis M, Hellaris R, Chen E, Goeddel DV. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptide of two different receptor guanylyl cyclase, *Nature.* 1989; **341**, p. 68-72
10. Anand-Srivastava MB, Srivastava AK, Cantin M. Pertussis toxin attenuated atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylyl cyclase: involvement of Gi guanine nucleotide regulatory protein, *J Biol Chem.* 1987; **262**, p. 4931-4934
11. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling TW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones, *J Biol Chem.* 1988; **263**, p. 9395-9401

12. Woodard G, Li X, Rosado J. Water deprivation enhances the inhibitory effect of natriuretic peptides on cAMP synthesis in rat renal glomeruli, *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; **287**, p. F418-F426
13. Woodard G, Li X, Rosado J. Characteristics of the renal C-type natriuretic peptide receptor in hypertrophied and developing rat kidney, *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005; **35**, p. 519-530
14. Anand-Srivastava MB, Sairam MR, Cantin M. Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylyl cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance receptors (C-ANF) to adenylyl cyclase/cAMP signal transduction system, *J Biol Chem*. 1990; **265**, p. 8566-8572
15. Hirata M, Chang CH, Murad F. Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle, *Biochem Biophys Acta*. 1989; **1010**, p. 346-351
16. Gilman AG. G proteins and dual control of adenylyl cyclase, *Cell*. 1984; **36**, p. 577-579
17. Bray P., Carter A., Somons C., Guo V., Puckett C., Kamholz J. Human cDNA clones for four species of G α , signal transduction protein, *Proc Natl Acad Sci*. 1986; **83**, p. 8893-8897
18. Itoh H., Toyama R., Kozasa T., Tsukamoto T., Matsuoka M., Kaziro Y. Presence of three distinct molecular species of Gi protein α subunits: structure of rat cDNAs and human genomic DNAs, *J Biol Chem*. 1988; **263**, p. 6656-6664
19. Anand-Srivastava MB. Downregulation of atrial natriuretic peptide ANP-C receptor is associated with alterations in G-protein expression in A10 smooth muscle cells, *Biochemistry*. 2000; **39**, p. 6503-6513
20. Boumati M, Li Y, Anand-Srivastava MB. Modulation of ANP-C receptor signaling by endothelin-1 in A10 smooth muscle cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002; **401**, p. 178-186
21. Boumati M, Li Y, Anand-Srivastava MB. Modulation of ANP-C receptor signaling by arginine-vasopressin in A-10 vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003; **415**, p. 193-202
22. Palaparti A, Anand-Srivastava MB. Angiotensin II modulates ANP-R2/ANP-C receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C, *J Mol Cell Cardiol*. 1998; **30**, p. 1471-1482
23. Bassil M, Anand-Srivastava MB. Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells, *Free Radical Biology & Medicine*. 2006; **41**, p. 1162-1173

24. Lane P, Gross SS. Cell signaling by nitric oxide, *Semin Nephrol.* 1999; **19**, p. 215-219
25. Madhani M, Scotland R, MacAllister R, Hobbs AJ. Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signalling, *British Journal of Pharmacology.* 2003; **139**, p. 1289-1296
26. Sun J, Oparil S, Lucchesi P, Thompson J, Chen Y. Tyrosine kinase receptor activation inhibits NPR-C in lung arterial smooth muscle cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; **281**, p. 155-163
27. Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, Genest J. Presence of "Ra" and "P" site receptor for adenosine coupled to adenylyl cyclase in cultured vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1982; **108**, p. 213-219
28. Di Fusco F, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi proteins in non-hypertrophic hearts from rats with hypertension-induced by L-NAME treatment, *Journal of Hypertension.* 2000; **18**, p. 1081-1090
29. Lappas G., Bou Daou G., Anand-Srivastava MB. Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gi α proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats, *Journal of Hypertension.* 2005; **23**, p. 2251-2261
30. Chakraborti T, Das S, Chakraborti S. Proteolytic activation of protein kinase C α by peroxynitrite in stimulating cytosolic phospholipase A₂ in pulmonary endothelium: involvement of a pertussis toxin sensitive protein, *Biochemistry.* 2005; **44**, p. 5246-5257
31. Lander H, Jacovina A, Davis R, Tauras J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species, *The Journal of Biological Chemistry.* 1996; **271** (33), p. 19705-19709
32. Kim S, Xu YJ, Katz S, Pelech S. Cyclic GMP-dependant and -independent regulation of MAP kinases by sodium nitroprusside in isolated cardiomyocytes, *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000; **1496**, p. 277-284
33. Lee J, Kim S, Jung M, Oh Y, Kim S. Altered Expression of Vascular Natriuretic Peptide Receptors in Experimental Hypertensive rats, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2002; **29** (4), p. 299-303
34. Hashim S, Anand-Srivastava MB. Losartan-induced attenuation of blood pressure in L-NAME hypertensive rats is associated with reversal of the enhanced expression of Gi α proteins, *Journal of Hypertension.* 2004; **22**, p. 181-190
35. Parsons W, Stiles G. Heterologous desensitization of the inhibitory A₁ adenosine receptor-adenylyl cyclase system in rat adipocytes, *The Journal of Biological Chemistry.* 1987; **262** (2), p. 841-847

36. Reithmann C, Gierschik P, Werden K, Jakobs K. Hormonal regulation of Gi alpha level & adenylyl cyclase responsiveness, *Brit J Clin Pharmacol.* 1990; **1**, p. 1185-1205
37. Wanstall JC, Homer KL, Doggrell SA. Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets, *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; **3** (1), p. 41-53
38. Wolin M. Interactions of oxidants with vascular signaling systems, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; **20**, p. 1430-1442
39. Palen DI, Belmadani S, Lucchesi PA, Matrougui K. Role of SHP-1 K.v. 1.2, and cGMP in nitric oxide-induced ERK1/2 MAP kinase dephosphorylation in rat vascular smooth muscle cells, *Cardiovasc Res.* 2005; **68** (2), p. 268-277
40. Park HS, Huh SH, Kim MS, Lee S, Choi EJ. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation, *PNAS.* 2000; **97** (26), p. 14382-14387
41. Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S. Nitric oxide/cGMP signaling pathway protects RAW264 cells against nitric oxide-induced apoptosis by inhibiting the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, *Pharmacol Sci.* 2006; **101** (2), p. 126-134
42. Oliveira C, Schindler F, Ventura A, Morais M, Arai R, Debbas V, Stern A, Monteiro H. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 2003; **35** (4), p. 381-396
43. Jope RS, Zhang L, Song L. Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells, *Arch Biochem Biophys.* 2000; **376** (2), p. 365-370
44. Pesse B, Levrant S, Feihi F, Waeber B, Gavillet B, Pacher P, Liaudet L. Peroxynitrite activates ERK via Raf-1 and MEK, independently from EGF receptor and p21Ras in H9C2 cardiomyocytes, *J Mol Cell Cardiol.* 2005; **38** (5), p. 765-775
45. Ge C, Anand-Srivastava MB. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in AII-mediated enhanced expression of Gi proteins in vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1998; **251**, p. 570-575

FIGURE LEGENDS

Figure 1 **Time course of SNAP treatment on NPR-C protein expression in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** **Upper panel:** A10 VSMC were incubated in the absence (control) or presence of 100 μ M SNAP for different time periods. Membranes were prepared and 50 μ g of membrane proteins from control and treated cells were used for Western Blotting for NPR-C protein expression as described previously (23). **Lower panel:** Quantification of protein bands shown in upper panel by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3 separate experiments. *** $p < 0.001$.

Figure 2 **Effect of SNAP on C-ANP₄₋₂₃-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were incubated in the absence (control) or presence of 100 μ M SNAP for 2 h or 24 h. Membranes were prepared and adenylyl cyclase activity was determined in the absence or presence of various concentrations of C-ANP₄₋₂₃. Basal enzyme activities in the presence of 10 μ M GTP γ S in control and SNAP-treated cells (2 h) were 47.8 ± 10.3 and 32.8 ± 8.0 pmol cAMP (mg protein-10 min)⁻¹, respectively, and at 24 h of treatment, were 63.7 ± 14.3 and 33.1 ± 6.1 pmol cAMP (mg protein-10 min)⁻¹, respectively. Values are means \pm SEM of 7 separate experiments performed in triplicates. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3 **Time Course of SNAP treatment on the expression of Gi α -2 and Gi α -3 protein in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** **Upper panel:** A10 VSMC were incubated in the absence (control) or presence of 100 μ M SNAP for different time periods. The cell lysates were used for Western Blotting and the detection of Gi α -2 (A), Gi α -3 (B) and

dynein was determined as described previously (28). **Lower panel:** Quantification of protein bands shown in upper panel by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3-4 separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 4 **Effect of ODQ, KT5823 and MnTBAP on SNAP-induced decreased expression of NPR-C protein in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** **Upper panel:** A10 VSMC were incubated in the absence (control) or presence of 20 μ M ODQ (A), 1 μ M KT5823 (B) or 20 μ M MnTBAP (C) 2 h prior to the treatment with SNAP (100 μ M) for 24 h. Membrane were prepared and 50 μ g of membrane proteins from control and treated cells were used for Western Blotting for NPR-C protein expression as described previously (23). **Lower panel:** Quantification of protein bands shown in upper panel by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3-5 separate experiments. *** $p < 0.001$

Figure 5 **Effect of SNAP, ODQ and KT5823 on ERK1/2, JNK and p38 phosphorylation in vascular smooth muscle cells (VSMC).** **Upper panel:** VSMC were incubated in the absence (control) or presence of 20 μ M ODQ or 1 μ M KT5823 2 h prior to the treatment with SNAP (100 μ M) for 24 h. The cell lysates (30 μ g) from control and treated cells were used for Western Blotting using specific antibodies phospho-Tyr²⁰⁴-ERK1/2, (A), phospho-Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵-JNK (B) and phospho-Tyr¹⁸²-p38 (C) for pERK1/2, pJNK and pp38 respectively, as described previously (29). Blots were also analyzed for total ERK (A), total JNK (B) and total p38 (C). **Lower panel:** Quantification of protein bands as performed by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 3-6 separate experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 6 **Effect of MnTBAP on SNAP-induced decreased phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38 in vascular smooth muscle cells (VSMC).**
Upper panel: VSMC were incubated in the absence (control) or presence of 20 μ M MnTBAP 2 h prior to the treatment with SNAP (100 μ M) for 24 h. Cell lysates (30 μ g) from control and treated cells were used for Western Blotting as described in the legend of figure 5. **Lower panel:** Quantification of protein bands as performed by densitometric scanning. The results are expressed as percentage of control taken as 100%. Values are means \pm SEM of 4-6 separate experiments. **** p < 0.01, *** p < 0.001.**

Figure 7 **Schematic model showing potential mechanisms responsible for the antihypertensive effect of nitric oxide (NO) in the attenuation of blood pressure.**

NO-induced inhibition of NPR-C and $G_i\alpha$ protein expression that result in an augmentation of cAMP levels may be a potential mechanism through which NO induces vasorelaxation and thereby regulates blood pressure. NO also exerts an antiproliferative effect through its ability to decrease the activation of MAPK signaling and it may be possible that NO-evoked decreased activation of MAPK may be responsible for the decreases in NPR-C and G_i protein expression. Dashed lines (- - -) denote possible link.

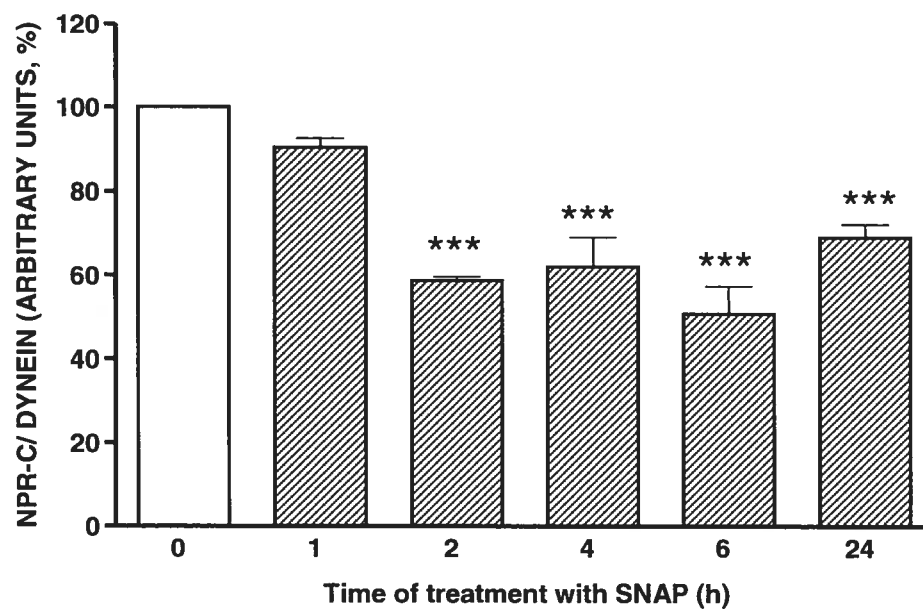
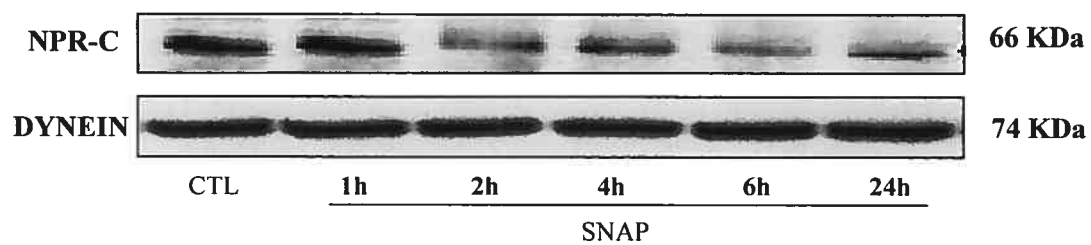


FIGURE 1

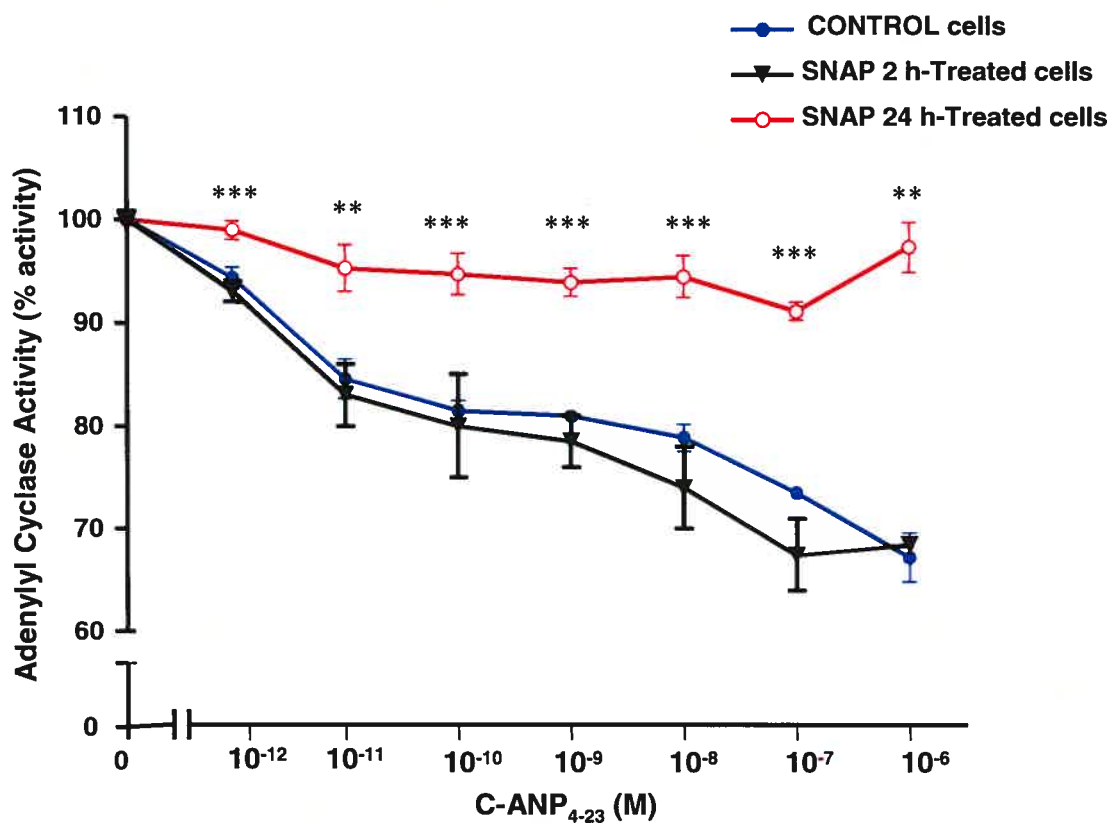


FIGURE 2

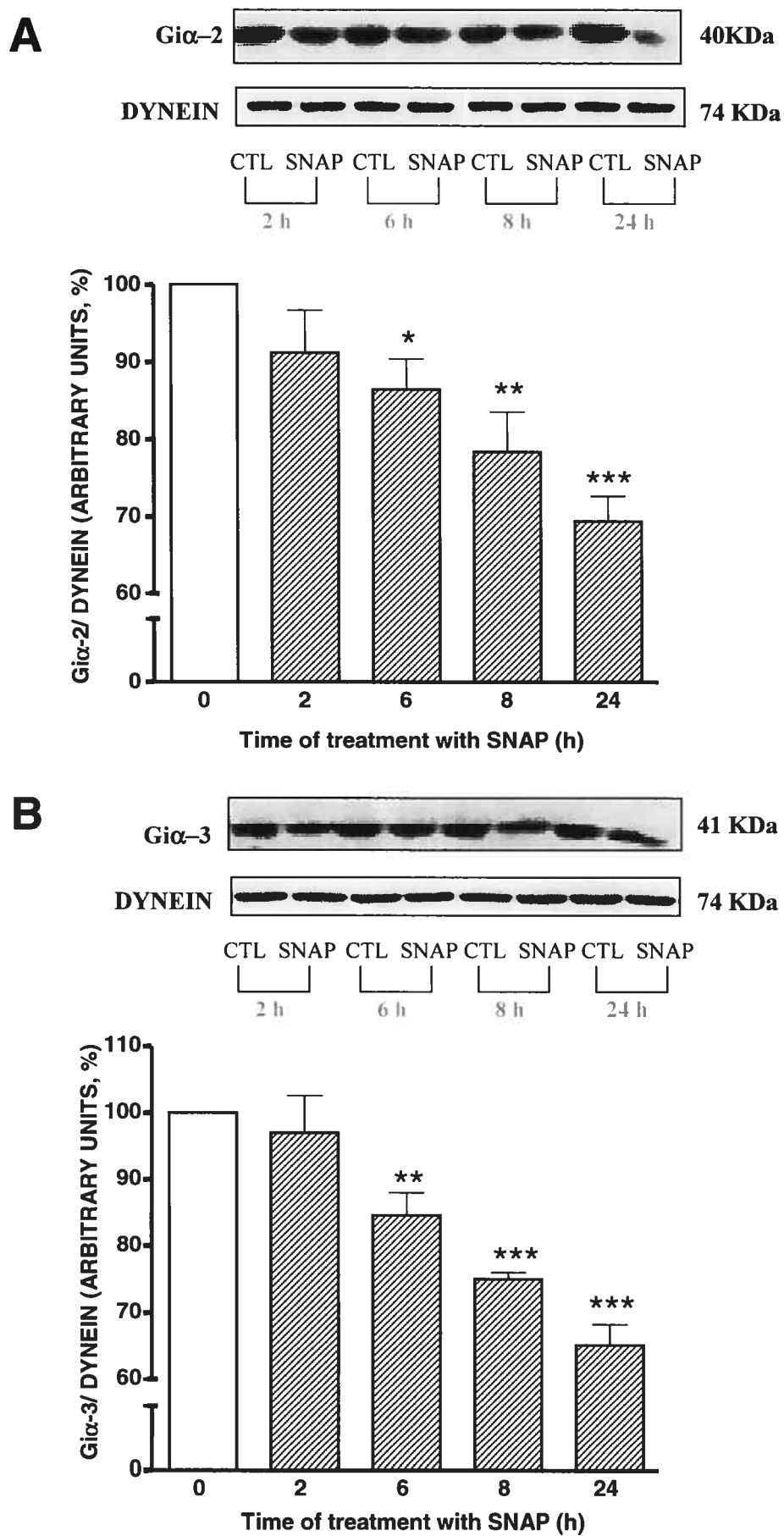


FIGURE 3

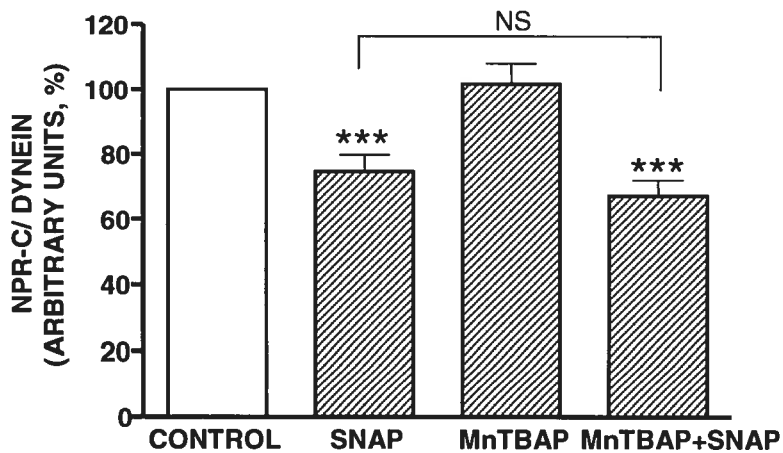
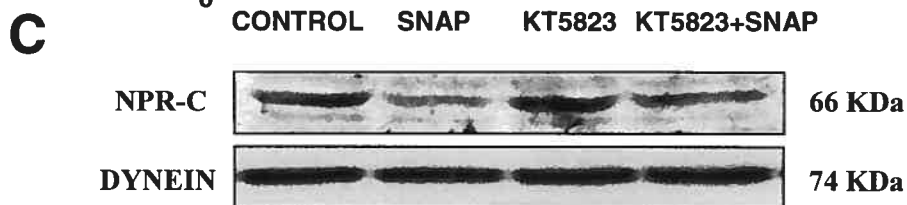
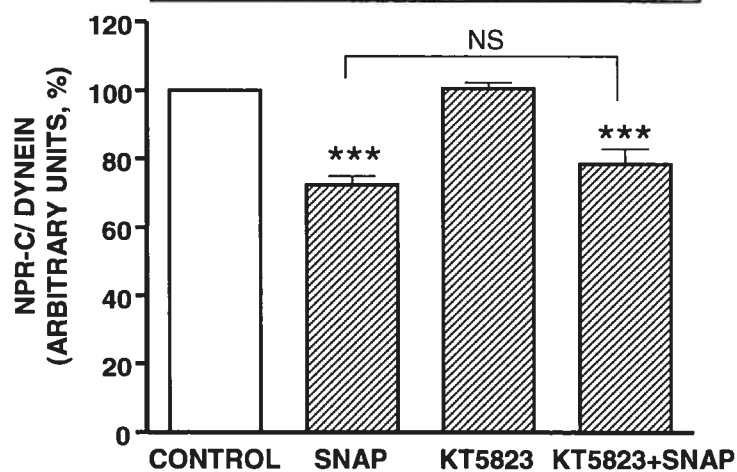
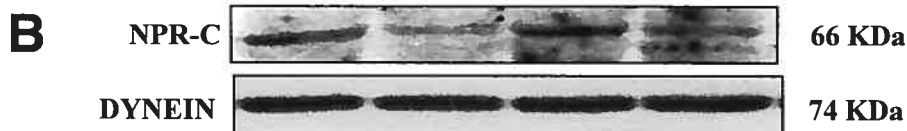
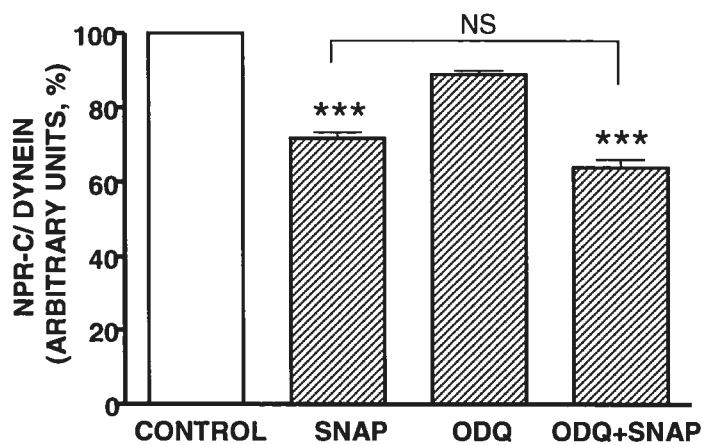
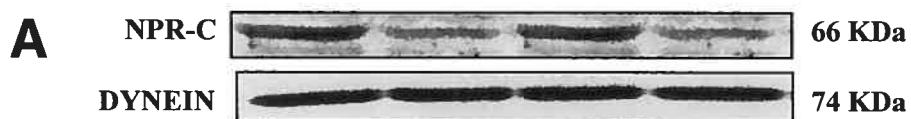


FIGURE 4

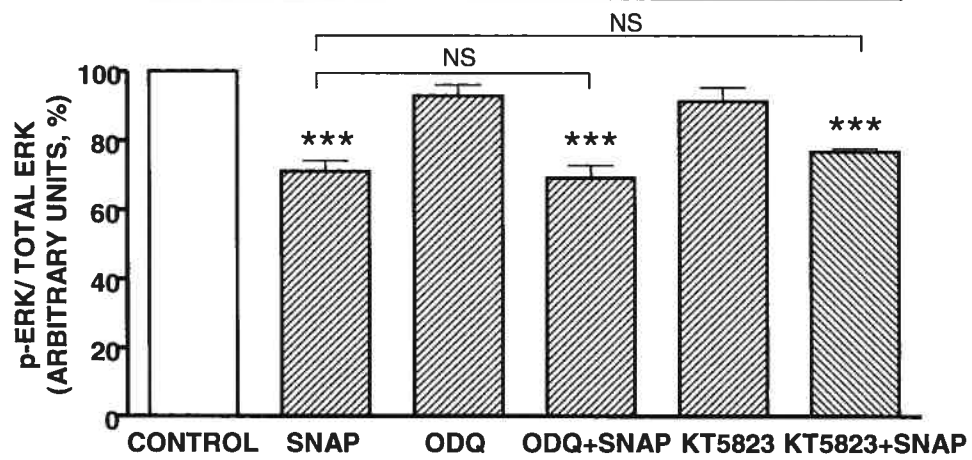
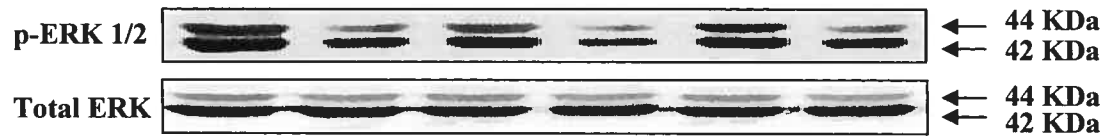
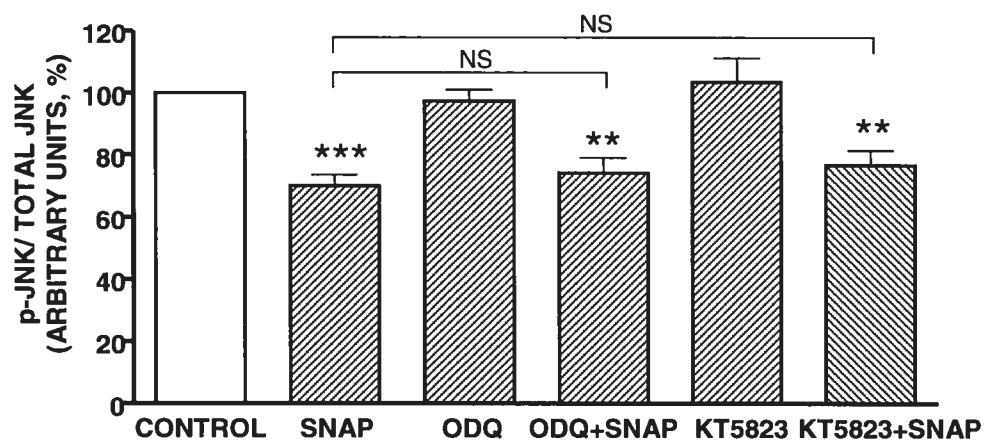
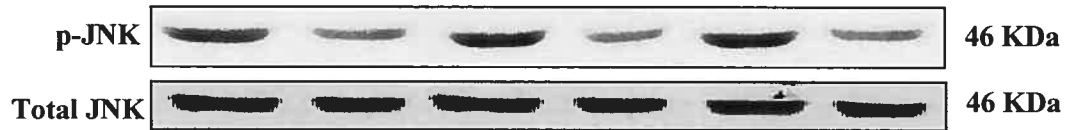
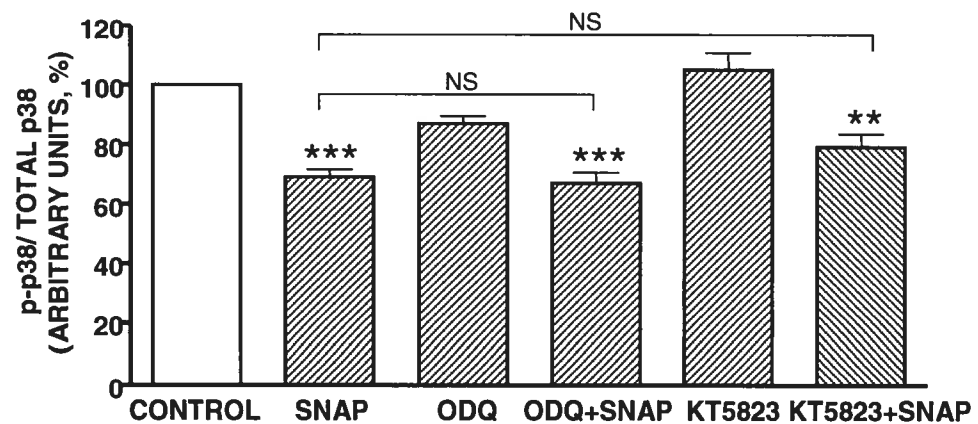
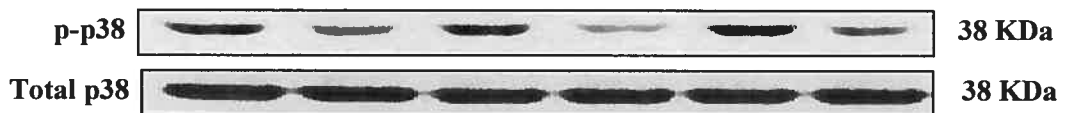
A**B****C**

FIGURE 5

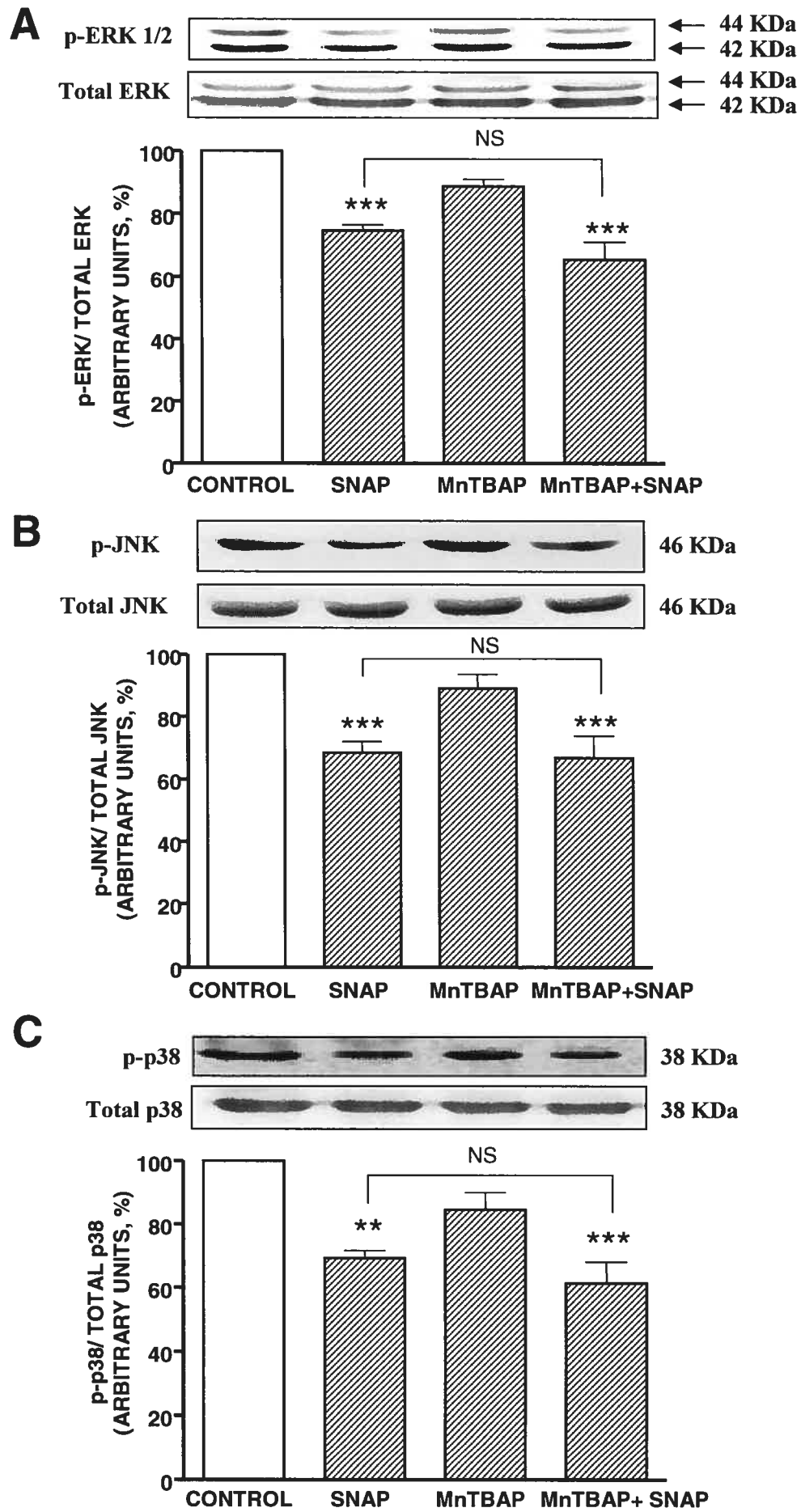


FIGURE 6

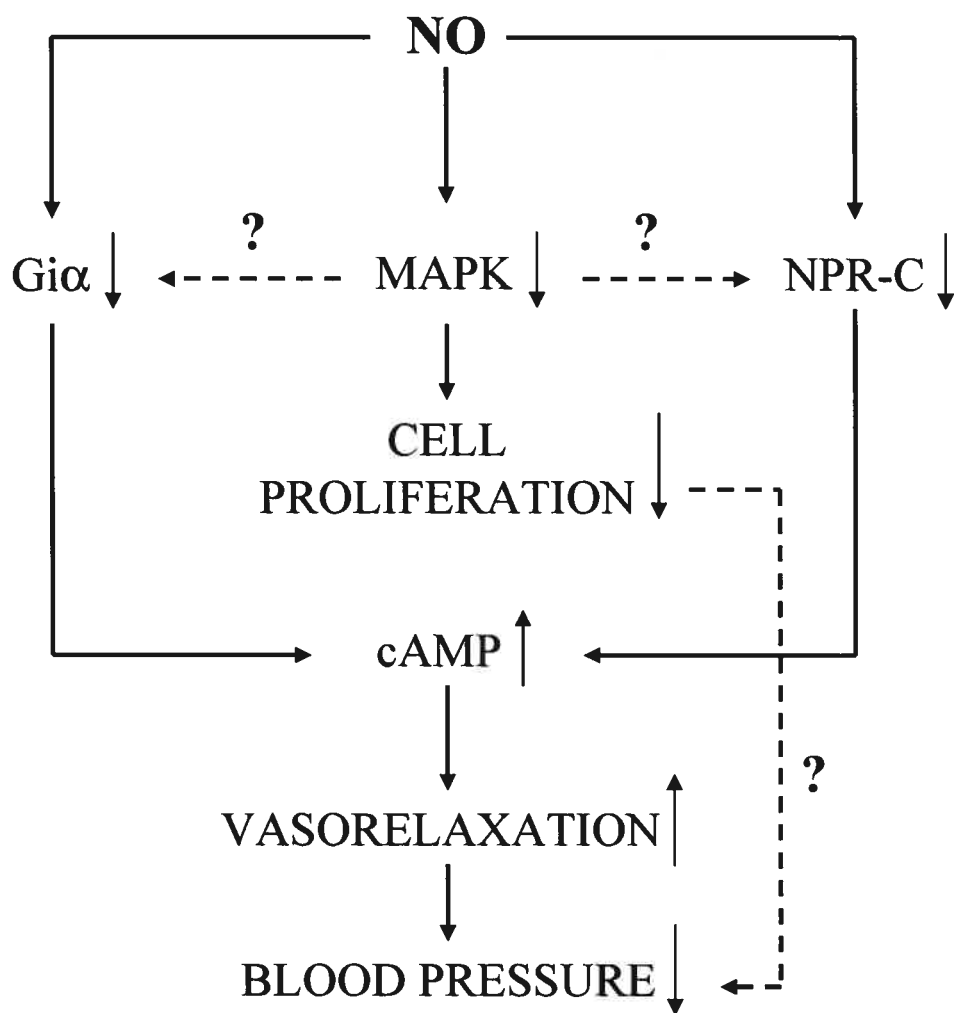


FIGURE 7

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE & CONCLUSION

DISCUSSION

Les études antérieures de notre laboratoire ont démontré que le traitement des rats avec du L-NAME, un inhibiteur de la NOS, engendre l'augmentation de la pression artérielle et de l'expression des protéines Gi mais atténue l'inhibition de l'AC stimulée par le NPR-C dans les cœurs de rats traités au L-NAME (rats L-NAME) (157). Pour qu'une atténuation de l'inhibition de l'AC soit observée, il faut que les composants de ce système, soit le récepteur soit les protéines Gi, soient régulés négativement. Puisqu'une augmentation de l'expression des protéines Gi a été observée dans les cœurs des rats L-NAME, l'atténuation de l'inhibition de l'AC suite à une stimulation du NPR-C ne peut pas être causée par les protéines Gi. Le seul composant qui pourrait moduler l'AC dans ces conditions est le récepteur dont la protéine NPR-C. En d'autres termes, la régulation négative du NPR-C dans les rats L-NAME pourrait causer l'atténuation de l'inhibition de l'AC malgré qu'une augmentation de l'expression des protéines Gi soit observée. Pour cette raison nous émettons l'hypothèse que le NO exerce un effet modulateur sur le NPR-C. La présente étude a donc été réalisée dans le but de déterminer l'effet du NO sur l'expression et la voie de signalisation de l'AC du NPR-C dans les CMLV. Les résultats de cette étude indiquent que le traitement des CMLV de type A10 avec du SNAP, un donneur de NO, pour une période de 24 h induit la diminution de l'expression du NPR-C, de Gi α -2, de Gi α -3 et abolit l'inhibition de l'AC induit par le NPR-C. Ces observations corroborent aux anciens résultats de notre laboratoire qui montrent une diminution de l'expression du NPR-C et de la signalisation de l'AC suite au traitement des CMLV de type A10 avec du SNAP pendant 24 h (158). D'autre part, nos résultats sont en désaccord avec certaines études *in vivo* qui documentent respectivement une diminution de l'ARNm du NPR-C et une inhibition de l'AC dans les aortes thoraciques et les cœurs de rats L-NAME (64,157). Selon ces observations, le traitement des CMLV avec du SNAP aurait dû en théorie induire une augmentation de l'expression du NPR-C et une inhibition accentuée de l'AC. Pourtant, nous avons observé le contraire, c'est-à-dire une diminution de l'expression et de la signalisation AC du NPR-C suite au traitement des CMLV avec du SNAP. La divergence entre ces résultats peut être attribuable aux différences dans la méthode et dans le type de traitement : une étude *in*

vitro comparée à une étude *in vivo*, un traitement aigu comparé à un traitement chronique (24 h de traitement vs. 4 semaines de traitement). Il se pourrait que la baisse de l'ARNm du NPR-C observée chez les rats L-NAME puisse être causée par l'influence du système rénine-angiotensine, système dont l'activité est augmentée dans les rats L-NAME, qui pourrait induire la baisse de l'expression du NPR-C. À cet égard, il a été démontré par notre laboratoire que le traitement des rats L-NAME avec du Losartan, un antagoniste du récepteur de type 1 de l'angiotensine, inverse l'atténuation de l'inhibition de l'AC médiée par le NPR-C au niveau contrôle, suggérant ainsi l'implication du système rénine-angiotensine dans la voie de signalisation du NPR-C (159).

Pour établir si une corrélation temporelle existe entre la baisse de l'expression du NPR-C et la baisse des protéines $G_i\alpha$, une étude en fonction du temps de l'ordre de 2, 6, 8 et 24 h a été réalisée dans les CMLV de type A10. Les résultats de cette analyse ont démontré que le NO diminue l'expression du NPR-C après 2 h de traitement avec du SNAP, alors que celle des protéines G_i ne diminue qu'après 6 h d'incubation. Ces données montrent que le NO n'affecte pas simultanément l'expression de ces protéines c'est-à-dire que l'expression du récepteur est diminuée en premier suivie par celle des protéines G_i . La variation de l'expression de la protéine NPR-C après 2 h de traitement au SNAP pourrait paraître surprenante sachant que l'altération de l'expression d'une protéine par un agent exogène ou endogène nécessite un minimum de quelques heures. Par contre, il y a des études qui documentent que l'expression de certaines protéines peut parfois être altérée après une courte période de traitement par un stimulus. À cet égard, *Li et al.* a démontré que l'expression des protéines $G_i\alpha-2$ et $G_i\alpha-3$ augmente après 30 minutes et 1 h de traitement avec l'angiotensine II (160). De plus, il a été observé que l'expression du récepteur du «*platelet activating factor*», une protéine de la famille des RCPG, augmente après 2 h de traitement dans les tissus pancréatiques de rats (161). Il est donc possible et probable que le SNAP puisse affecter l'expression de la protéine NPR-C après 2 h de traitement.

Il est à mentionner que nous avons décidé d'évaluer la variation de l'expression des protéines NPR-C et G_i sur une période de 24 h car même si le SNAP produit du NO

immédiatement après solubilisation et qu'il possède une demi-vie courte de 5 h (162), l'expression du NPR-C ou des protéines Giα ne peut pas être modulée après quelques minutes. De plus, l'activation des voies de signalisation par le NO n'est pas instantanée comme la production du NO par le SNAP. En d'autres termes, même si le SNAP produit du NO en quelques minutes et peut modifier l'activation de certaines kinases dans une courte période de temps (minutes), le NO ne peut pas activer ou inhiber la transcription et la traduction d'une protéine dans 1-2 minutes. L'effet du NO sur l'expression d'une protéine peut être observé qu'après un certain délai et il n'est donc pas instantané. En d'autres termes, le NO qui a été relâché par le SNAP après 30 minutes d'incubation pourrait entraîner des effets intracellulaires qu'après quelques heures.

L'expression d'une protéine dépend à la fois de la régulation transcriptionnelle et traductionnelle mais aussi du phénomène de la dégradation protéique. Il est donc possible que la diminution de l'expression du NPR-C observée après 2 h soit causée par une régulation négative de la transcription, de la traduction ou par une dégradation protéasomale. À cet égard, il a été démontré que le NO active la dégradation protéasomale dans les cellules endothéliales (163). Par ailleurs, certaines études montrent que le NO inhibe la voie d'activation du protéasome dans les CMLV et les macrophages (164,165). Bien que nous soyons convaincus que la régulation négative du NPR-C par le NO suivant 2 h d'incubation des CMLV au SNAP soit due à une diminution de l'expression du NPR-C, il serait toutefois intéressant d'investiguer le mécanisme par lequel le NO induit la baisse de l'expression de cette protéine après 2 h. En d'autres termes, est-ce que le NO engendre la diminution de l'expression du NPR-C en inhibant la traduction, la transcription ou en activant la voie du protéasome? La réponse à cette question n'est pas encore claire et nécessite des études ultérieures.

Il est toutefois intéressant de mentionner que malgré la diminution de l'expression du NPR-C après 2 h d'incubation des CMLV de type A10 en présence de SNAP, l'inhibition de l'AC induite par le NPR-C n'était pas affectée. En d'autres termes, la baisse de l'expression du récepteur n'a pas influencé la fonction de cette protéine: le NPR-C a inhibé la production de l'AMPc comme dans les cellules témoin. Il se pourrait que la baisse du niveau de l'AMPc observée après 2 h d'incubation des CMLV de type

A10 au SNAP puisse être responsable de la diminution des protéines Gi observée après 6 h de traitement. À cet effet, il a été démontré que l'exposition des adipocytes au N⁶-phenylisopropyladenosine, un agoniste du récepteur adénosine de type 1 inhibant la production d'AMPc, diminuait les niveaux des protéines Gi (166).

Nous avons également démontré une corrélation entre l'expression du NPR-C et l'activité AC de ce récepteur après 24 h de traitement des CMLV de type A10 avec du SNAP. La baisse de l'expression du NPR-C après 24 h de traitement avec du SNAP était accompagnée d'une diminution de l'inhibition de l'AC. Cette relation entre la baisse de l'expression du NPR-C et l'atténuation de l'inhibition de l'AC par le NO était par contre absente après 2 h, ce qui pourrait être une conséquence de l'expression non altérée des protéines Gi après cette période de temps. Ainsi, il se pourrait que les protéines Gi aient compensé la baisse de l'expression du NPR-C en inhibant l'AC comme dans les niveaux contrôles. Ces résultats indiquent que l'atténuation de l'inhibition de l'AC induite par le NPR-C se déroule seulement lorsque les deux composants de cette voie de signalisation, c'est-à-dire le NPR-C et les protéines Gi, sont tous les deux régulés négativement. La baisse de l'expression du NPR-C n'est pas suffisante pour entraîner une modification dans l'inhibition de l'activité de l'AC. Ce concept est confirmé par les résultats de notre étude qui démontrent une diminution de l'inhibition de l'AC seulement lorsqu'une diminution simultanée de l'expression des protéines Gi α et du NPR-C est observée après 24 h. Ces observations sont en accord avec des données précédentes de notre laboratoire qui ont indiqué que l'effet cumulatif de la diminution des protéines Gi et de la densité du NPR-C suite au traitement des CMLV avec du C-ANP₄₋₂₃ pendant 24 h, est responsable de la baisse de l'inhibition de l'AC (53).

Pour identifier si le NO altère l'expression de la protéine NPR-C par l'intermédiaire de mécanismes impliquant la GMPc/PKG, les CMLV de type A10 ont été incubées avec du SNAP en présence ou en absence de l'inhibiteur de la GCs, l'ODQ. Nos résultats démontrent que l'ODQ n'a pas inversé la diminution de l'expression du NPR-C au niveau témoin, suggérant que la diminution de l'expression du NPR-C par le SNAP ne dépend pas d'un mécanisme GMPc-dépendant mais ferait intervenir d'autres

mécanismes moléculaires. L'ODQ est considéré comme un inhibiteur sélectif de la GCs par plusieurs chercheurs (167,168) néanmoins, certains auteurs démontrent le contraire car il a été observé que l'ODQ peut réagir avec des hémoprotéines autres que la GCs (169). Pour assurer l'exactitude de nos résultats, nous avons incubé les CMLV de type A10 avec un inhibiteur de la PKG, le KT5823. Le traitement des CMLV au SNAP en présence de KT5823 n'a pas inversé la diminution de l'expression du NPR-C. Même si certains auteurs ne sont pas convaincus de la sélectivité de l'ODQ ou du KT5823 (170), les résultats obtenus par le traitement des CMLV avec ces deux inhibiteurs sont similaires et appuient notre conclusion qui suggère que le NO module l'expression de la protéine NPR-C par l'intermédiaire de mécanismes indépendants de la GMPc. À cet égard, bien que le mode classique de signalisation du NO soit celui de la GMPc/PKG, il a été cependant démontré que le NO régule un ensemble de fonctions physiologiques comme l'inhibition de l'apoptose, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la vasorelaxation par l'intermédiaire de mécanismes GMPc-indépendants (171). De plus, puisque le NO peut médier certains de ses actions via le peroxy-nitrite, nous avons évalué si le peroxy-nitrite formé par l'interaction du NO et de l'anion superoxyde est responsable de l'altération de l'expression du NPR-C par le SNAP. Nos résultats indiquent que le MnTBAP, un chélateur sélectif de l'anion superoxyde, n'a pu influencer la diminution de l'expression de la protéine NPR-C et suggèrent que le peroxy-nitrite n'est pas impliqué dans la diminution de l'expression du NPR-C par le SNAP.

Il a été auparavant démontré par notre laboratoire que la voie des MAPK est impliquée dans la régulation de l'expression des protéines Gi stimulée par l'angiotensine II dans les CMLV de type A10 (172). Afin de déterminer si cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la régulation de l'expression du NPR-C et des protéines Gi α par le NO, nous avons testé l'effet d'une augmentation de la production du NO par le SNAP sur le degré de phosphorylation de ERK1/2, JNK et p38 suite à un traitement de 24 h. Les résultats de cette analyse ont montré que le NO induit une diminution de la phosphorylation de ERK1/2, JNK et p38 dans les CMLV suite à un traitement de 24 h au SNAP. Nos observations sont en accord avec d'autres études qui montrent que le NO

diminue le degré de phosphorylation de ERK1/2, JNK et p38 dans divers types cellulaires tels que dans les CMLV et les macrophages alvéolaires (173,174). D'autre part, nos résultats sont en désaccord avec quelques études qui attestent que le NO stimule la phosphorylation des différentes MAPK dans divers types de cellules suite à un traitement au SNAP (175,176). La non concordance entre ces résultats pourrait être attribuée aux différences dans les lignées cellulaires (cellules endothéliales vs. CMLV) et dans le temps de traitement (minutes vs. heures) puisqu'une concentration identique de SNAP a été utilisée dans les deux études. Bien que nous n'ayons pas réalisé une étude complète, nos résultats préliminaires nous permettent d'affirmer que même à des temps courts de stimulation tel 2 h, la stimulation des CMLV par le SNAP n'a pas induit l'activation de ERK, JNK et p38. Il est toutefois à noter que la diminution du NPR-C, des protéines $G_{i\alpha}$ et des MAPK induite par le NO n'est pas due au phénomène de la toxicité cellulaire car la viabilité cellulaire évaluée par la technique d'exclusion au trypan bleu est supérieure à 95%.

Nous avons également démontré que la diminution du degré de phosphorylation de ERK1/2, JNK et p38 induite par le NO n'implique ni les voies de signalisation dépendantes de la GMPc ni la signalisation du peroxy-nitrite car l'ODQ, le KT5823 ainsi que le MnTBAP n'ont pas influencé la diminution de la phosphorylation des MAPK. Nos résultats, qui illustrent que le NO module le degré d'activité des MAPK par un mécanisme indépendant de la GMPc, sont en accord avec certaines études qui rapportent que le NO peut agir par des mécanismes dépendants et indépendants de la GMPc pour altérer l'activation de ERK1/2, JNK et p38 (173,177). Certains rapports mentionnent que le NO stimule le degré de phosphorylation des MAPK par l'intermédiaire de la molécule du peroxy-nitrite (178) même si nos résultats ont clairement illustré le contraire. La divergence entre ces résultats et nos observations vient possiblement des différences dans les types cellulaires utilisés et dans les méthodes du traitement : CMLV vs. cellules PC12, arrêt de la production endogène du peroxy-nitrite par un chélateur vs. administration exogène du peroxy-nitrite (500 μ M), temps d'incubation de 5 minutes (peroxy-nitrite) vs. incubation de 24 h (chélateur).

En résumé, nous avons démontré que le NO diminue l'expression des protéines NPR-C, $G_{i\alpha-2}$, $G_{i\alpha-3}$ ainsi que le degré de phosphorylation des MAPK par l'intermédiaire de mécanismes GMPc-indépendant. Il se pourrait que la diminution du degré d'activation des MAPK induite par le NO soit responsable de la baisse de l'expression du NPR-C et des protéines Gi. À cet égard, les études précédentes de notre laboratoire ont démontré l'implication de la voie de signalisation des MAPK et de la phosphoinositol-3-kinase (PI3K) dans le contrôle de l'expression des protéines Gi suite à la stimulation des CMLV par l'angiotensine II (172). Néanmoins, nous avons démontré que la voie de la PI3K n'est pas impliquée dans la modulation de l'expression du NPR-C par le NO dans les CMLV de type A10 (résultats non publiés). De plus, nous avons également montré que l'incubation des CMLV au SNAP pour 2 h diminue les taux de phosphorylation des MAPK (résultats non publiés). Cette diminution de l'activité des MAPK pourrait possiblement être responsable de la diminution de l'expression de la protéine NPR-C après 2 h. À la lumière de ces observations, nous suggérons que la diminution du degré d'activation des MAPK ainsi que l'inhibition de l'expression du NPR-C et de $G_{i\alpha}$ qui résulteraient en une augmentation des niveaux d'AMPc représentent deux mécanismes potentiels par lesquels le NO pourrait réguler les phénomènes de vasorelaxation et de prolifération cellulaire et par conséquent, maintenir la balance de la pression artérielle (*Chapitre 2, Figure 7*).

Il a été auparavant démontré que la diminution de l'ARNm du récepteur muscarinique de type 2, un RCPG couplé aux protéines Gi, engendre l'augmentation de l'AMPc intracellulaire dans des cellules pulmonaires humaines embryonnaires (HEL299) (179). Une élévation des niveaux d'AMPc s'accompagne en théorie par une augmentation de l'hydrolyse de l'AMPc par les phosphodiésterases (PDE). À cet égard, une augmentation de l'activité des PDE a été démontré dans les adénomes produisant des hauts niveaux d'AMPc (180). Pour que le NO puisse induire la vasorelaxation via l'inhibition de l'expression du NPR-C et de $G_{i\alpha}$, il faudrait en principe que le NO inhibe l'hydrolyse de l'AMPc par les PDE. À cet effet, il a déjà été démontré que le NO bloque l'activité des PDE 3 dans les CMLV aortiques (181). D'autre part, une augmentation de l'expression protéique de la PDE 4B par le NO a été observée dans les

CMLV pulmonaires (182). Il serait par conséquent intéressant de tester dans nos conditions expérimentales l'effet du NO sur les PDE spécifiques à l'AMPc, les PDE 3, 4, 7 et 8, dans les CMLV. Cette analyse permettrait d'identifier si l'inhibition de la voie du NPR-C conduirait effectivement à une augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire dans les CMLV. Si les résultats révèlent que le NO inhibe l'activité des PDE spécifiques à l'AMPc, cela indique que le NO médie la vasorelaxation non seulement par l'inhibition de l'expression du NPR-C et des protéines $G_i\alpha$ mais aussi par l'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaires.

Si nous extrapolons nos résultats à l'échelle *in vivo*, le NO produit par les cellules endothéliales diffuse vers les CMLV et induit une diminution de l'expression des protéines NPR-C et $G_i\alpha$ des CMLV. La régulation négative de ces protéines engendre à leur tour l'augmentation de la production et de la concentration d'AMPc et par conséquent, la hausse de l'activation des PKA. De plus, puisque la diminution de l'expression du NPR-C entraîne la suractivation du NPR-A, la baisse de l'expression du NPR-C par le NO va par conséquent induire l'activation du NPR-A. L'augmentation de l'activité de ce dernier stimule à son tour la production du messenger second de la GMPc et l'activation des PKG. L'activation globale des PKA et des PKG par le NO conduirait à la vasorelaxation et donc à la baisse de la pression artérielle (**Chapitre 3, Figure 1**). Suivant la même logique, une déficience en NO contribuerait à maintenir une expression élevée des protéines du NPR-C et de $G_i\alpha$ et par conséquent, à la hausse du processus de vasoconstriction et de la pression artérielle (**Chapitre 3, Figure 1**). Puisque une relation existe entre le NPR-A et le NPR-C, la hausse de l'expression du NPR-C engendrerait la régulation négative du NPR-A, des PKG et en conséquence, induirait l'augmentation de la pression artérielle. Les études précédentes de notre laboratoire ont démontré que le traitement des rats avec du L-NAME, un inhibiteur de la NOS, engendre l'augmentation de la pression artérielle, l'expression des protéines $G_i\alpha$ mais induit l'atténuation de l'inhibition de l'AC stimulée par le NPR-C (**Chapitre 3, Figure 1**) (157). L'atténuation observée dans les rats L-NAME pourrait être due à la régulation négative du NPR-C. En se basant sur les résultats de cette étude, la hausse de la concentration du NO devrait théoriquement conduire à une inhibition accentuée de l'AC, la régulation positive du

NPR-C et la diminution de l'expression des protéines Gi. Nos résultats *in vitro* prouvent par contre le contraire : une atténuation de l'inhibition de l'AC par le NPR-C ainsi que la régulation négative du NPR-C. Cependant, il faut tenir compte que dans les études *in vivo*, l'interaction des systèmes physiologiques peut générer des réponses différentes de celles *in vitro*. Il serait par conséquent intéressant de mesurer directement l'expression du NPR-C dans les rats L-NAME et de comparer les résultats aux observations de la présente étude.

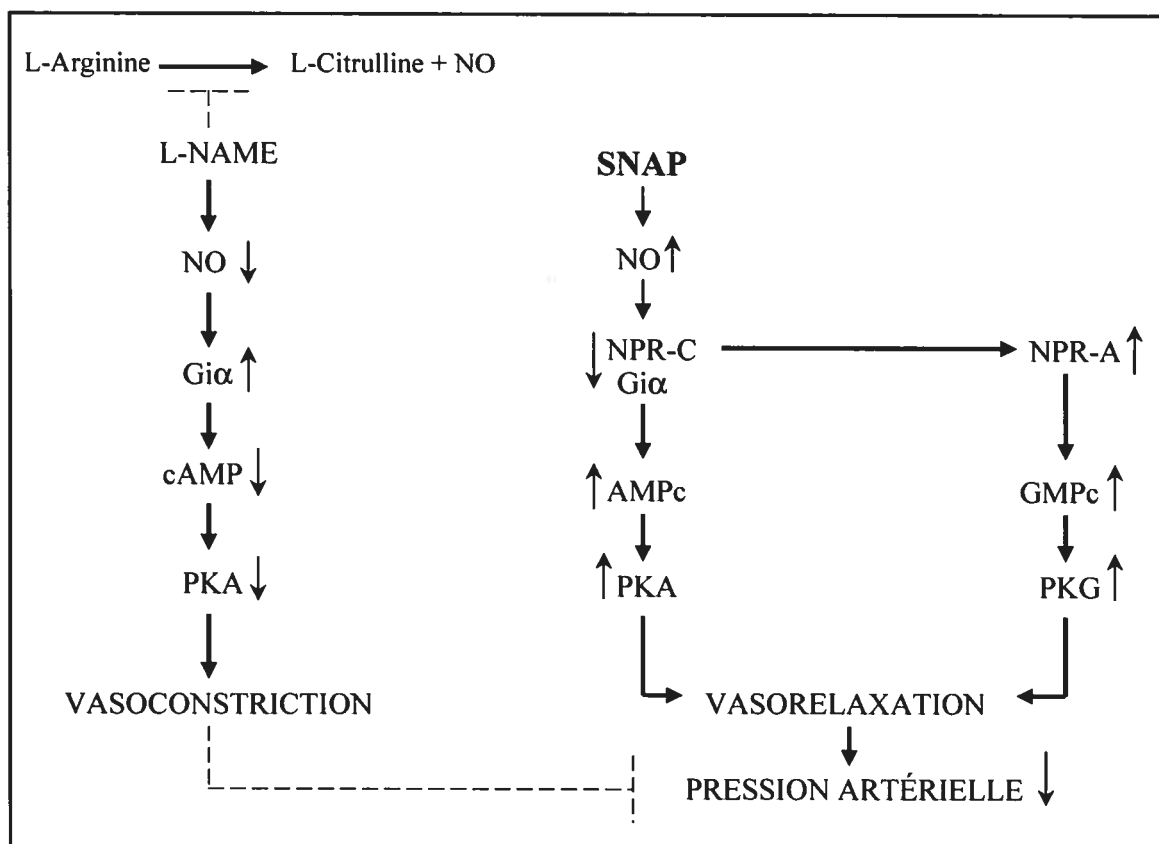


Figure 1. Schéma récapitulatif de l'effet du N⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) et du monoxyde d'azote (NO) sur le récepteur natriurétique de type C (NPR-C), les protéines Giα et de l'interrelation entre le NPR-C et le récepteur natriurétique de type A (NPR-A). Abréviations : AMPc, adénosine monophosphate cyclique; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; NO, monoxyde d'azote; PKA, protéine kinase dépendante de l'AMPc; PKG, protéine kinase dépendante de la GMPc.

Pour conclure, la régulation négative du NPR-C et des protéines Gi par le NO représente un mécanisme moléculaire bénéfique par lequel le NO peut réguler la pression artérielle en conditions physiologiques. D'autre part, en conditions pathologiques telle l'hypertension où le système NPR-C/AC est suractivé (24,61), l'apport exogène du NO sous forme de traitement pourrait représenter un horizon thérapeutique efficace pour contrer l'effet vasoconstricteur de la voie du NPR-C.

PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons démontré un lien potentiel entre la voie des MAPK et les protéines NPR-C et Gi. Par contre, il reste encore plusieurs questions sans réponses. Pour les prochaines étapes du cheminement de ce projet nous suggérons d'examiner précisément le lien qui unit les MAPK au NPR-C et à Gi. Tout d'abord, le laboratoire planifie de réaliser une étude en fonction du temps (10 min, 30 min, 1, 2, 6, 8, 24 h) du degré de phosphorylation des MAPK suite à un traitement au SNAP. Cette analyse permettra de comparer si la diminution de l'expression du NPR-C et de Gi α concorde avec la baisse du degré d'activation des MAPK. Si les résultats révèlent que le degré d'activation des MAPK diminue en même temps ou précède la diminution de l'expression des protéines NPR-C et de Gi α , cela implique que les MAPK pourraient être responsables de l'altération de l'expression du NPR-C et de Gi α par le SNAP. De plus, jusqu'à présent, nous ne connaissons pas si le NO agit directement sur les protéines de la voie des MAPK ou s'il modifie indirectement l'action de ces dernières en faisant intervenir d'autres protéines cytoplasmiques ou nucléaires. En d'autres termes, il n'est pas connu si le NO inhibe la phosphorylation des MAPK en bloquant directement les sites de phosphorylation de ERK1/2, JNK et p38 par nitrosylation des résidus cystéine ou en affectant l'activité des protéines en amont des MAPK, telles que Ras/Raf-1, MEK1/2, MEK4/7, MEK3/6. De plus, puisque le NO affecte de façon comparable l'activation de ERK, JNK et p38, il est très probable que le NO inhibe la voie des MAPK en inhibant les protéines en amont de ERK, JNK et p38. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait tester l'effet du NO sur le degré de phosphorylation de Ras/Raf-1, MEK1/2, MEK4/7, MEK3/6. Par la suite, pour prouver que la signalisation des MAPK

est impliquée dans la modulation de l'expression du NPR-C et de $G_i\alpha$ par le NO, il faudrait incuber les CMLV avec les inhibiteurs de MEK1/2, MEK4/7, MEK3/6 en absence ou en présence du SNAP. Cette étude permettra de déterminer si toutes les voies des MAPK c'est-à-dire ERK, JNK et p38, sont impliquées dans la modulation de l'expression du NPR-C et de $G_i\alpha$ par le NO et de corroborer les observations de la présente étude. Si les données révèlent que la voie des MAPK est impliquée dans la régulation de l'expression des protéines NPR-C et $G_i\alpha$, nous suggérons d'investiguer les facteurs nucléaires impliqués dans le contrôle de l'expression de ces protéines. Si toutefois les résultats indiquent que les MAPK ne sont pas les éléments clés de la régulation de l'expression de ces protéines, il reste à découvrir le mécanisme par lequel le NO régule l'expression du NPR-C et de $G_i\alpha$.

Ensuite, pour démontrer si la voie du protéasome est impliquée dans la modulation de l'expression du NPR-C, des CMLV seront incubées avec du SNAP (2 h) en présence ou en absence de l'inhibiteur des protéasomes, la lactacystine (183). Si les résultats montrent que la diminution de l'expression du NPR-C n'est pas affectée par la lactacystine, cela implique que la régulation négative du NPR-C par le NO à 2 h se fait à l'échelle de l'expression et non de la dégradation protéique. Il serait également pertinent d'investiguer si le NO affecte l'expression du NPR-C et des G_i uniquement au niveau de la synthèse protéique (traduction des ARNm) et/ou si la quantité d'ARNm codant pour ces derniers est aussi altérée par le NO. Pour évaluer cet aspect du projet, la technique de Northern Blot doit être exécutée afin de voir l'effet du NO sur la production d'ARNm du NPR-C et des protéines $G_i\alpha$. En dernier lieu, nous planifions de vérifier l'effet du NO sur l'expression du NPR-C en mesurant directement l'expression protéique du NPR-C par immunobuvardage et la quantité d'ARNm par Northern Blot dans des homogénats isolés de cœur de rats traités au L-NAME (étude *in vivo*).

CONCLUSION

Nous avons démontré que le traitement des CMLV de type A10 avec du SNAP, un donneur de NO, a diminué l'expression des protéines NPR-C, $G_i\alpha-2$ et $G_i\alpha-3$ ainsi que l'activation de ERK1/2, JNK et p38. De plus, l'ODQ, l'inhibiteur de la GCs, et le KT5823, l'inhibiteur des PKG, n'ont pas normalisé l'expression du NPR-C et le degré de phosphorylation des MAPK au niveau basal, suggérant que le NO régule l'expression et l'activité de ces protéines via un mécanisme indépendant de la GMPc. De même, le MnTBAP, un chélateur du peroxy-nitrite, n'a pas influencé la diminution de l'expression du NPR-C et de l'activité des MAPK par le SNAP, suggérant que le peroxy-nitrite n'est pas impliqué dans l'inhibition de l'expression du NPR-C et de la phosphorylation des MAPK par le SNAP. En conclusion, la régulation négative du NPR-C et des protéines G_i par le NO, qui résulterait en une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc pourrait représenter un mécanisme additionnel par lequel le NO régule la pression artérielle.

RÉFÉRENCES

1. Marieb E. *Anatomie et Physiologie Humaine*, 2e edition, ERPI: Montreal, 1999, p. 830, 694-745
2. Knowles R., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem Journal*. 1994; **298**, p. 249-258
3. Nakashima H., Suzuki H., Ohtsu H., Chao J., Utsunomiya H., Frank G., Eguchi S. Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: Recent topics of angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature, *Current Vascular Pharmacology*. 2006; **4** (1), p. 67-78
4. Potter L., Abbey-Hosch S., Dickey D. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocrine Reviews*. 2006; **27** (1), p. 47-72
5. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davi G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2006; **16**, p. 222-233
6. Carretero O., Oparil S. Essential Hypertension, Part I: Definition and Etiology, *Circulation*. 2000; **101**, p. 329-335
7. Genest G., Kuchel O., Hamet P., Cantin M. *Hypertension- Physiopathology and Treatment*, 2e edition, McGraw-Hill Book Company: Montreal, 1983, p. 3, 679-13, 681
8. Yanofsky S., Shen E., Holden F., Whitehorn E., Aguilar B., Tate E., Holmes C., Scheurman R. Allosteric activation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor by selective, non peptide agonists, *J Biol Chem*. 2006; **281** (19), p. 13226-13233
9. Hollmann M., Strumper D., Herroeder S., Durieux M. Receptors, G proteins and their interactions, *Anesthesiology*. 2005; **103**, p. 1066-1078
10. Wess J. G-protein-coupled receptors: Molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition, *FASEB J*. 1997; **11**, p. 346-354

11. Anand-Srivastava MB. Atrial natriuretic peptide-C receptor and membrane signalling in hypertension, *Journal of Hypertension*. 1997; **15**, p. 815-826
12. Rothenberg PL., Kahn CR. Insulin inhibits pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G-proteins. Evidence for a novel interaction between insulin receptors and G proteins, *J Biol Chem*. 1988; **263**, p. 15546-15552
13. Koolman J., Röhm K. *Atlas de poche de biochimie*, Medecine-Sciences, Paris, 1999, p. 364-366
14. Voet D., Voet J. *Biochimie*, De Boeck: Paris, 1998, p. 1276-1280
15. Clapham DE., Neer EJ. G protein $\beta\gamma$ subunits, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; **31**, p. 6492-6498
16. Anand-Srivastava MB, Palaparti A., Pion J. Differential regulation of G-protein expression by vasoactive peptides, *Mol Cell Biochem*. 1997; **176**, p. 21-27
17. Boumati M., Li Y., Anand-Srivastava MB. Modulation of ANP-C receptor signaling by endothelin-1 in A-10 smooth muscle cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002; **401**, p. 178-186
18. Boumati M., Li Y., Anand-Srivastava MB. Modulation of ANP-C receptor signaling by arginine-vasopressin in A-10 vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003; **415**, p. 193-202
19. Sunahara RK., Taussig R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: Multiplicities of signaling, *Molecular Interventions*. 2002; **2** (3), p. 168-184
20. Triner Z., Vulliemoz Y., Verosky M., Habif DV., Nahas W. Adenylate cyclase phosphodiesterase system in arterial smooth muscle, *Life Science*. 1972; **11**, p. 817-824
21. Feldman AM., Cates AE., Bristow MR., Van Dop C. Altered expression of α -subunits of G proteins in failing human hearts, *J Mol Cell Cardiol*. 1989; **21**, p. 359-365

22. Lynch CJ., Blackmore PF., Johnson EH. Guanine nucleotide binding regulatory proteins and adenylate cyclase in livers of streptozotocin and BB/W or diabetic rats, *J Clin Invest.* 1989; **83**, p. 2050-2062
23. Anand-Srivastava MB. Altered responsiveness of adenylate cyclase to adenosine and other agents in the myocardial sarcolemma and aorta of spontaneously hypertensive rats, *Biochem Pharmacol.* 1988; **37**, p. 3017-3022
24. Anand-Srivastava MB, De Champlain J., Thibault C. DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins, *Am J Hypertens.* 1993; **6**, p. 72-75
25. Levin ER., Gardner DG., Sawson WK. Natriuretic peptides, *N Engl J Med.* 1998; **339**, p. 321-328
26. Espiner EA., Richards AM., Yandle TG., Nicholls MG. Natriuretic hormones, *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1995; **24**, p. 481-509
27. Stash JP., Hirth-Dietrich C., Kazda S., Neuser D. Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo, *Life Sci.* 1989; **45**, p. 869-875
28. Soualmia H., Barthelemy C., Masson F., Maistre G., Eurin J., Carayon A. Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue, *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997; **29**, p. 605-611
29. Lachance D., Garcia R., Gutkowska J., Cantin M., Thibault G. Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces, *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; **135**, p. 1090-1098
30. Nakayama T. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases, *Endocrine Journal.* 2005; **52** (1), p. 11-21
31. Boomsma F., van den Meiracker AH. Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use, *Cardiovascular Research.* 2001; **51** (442), p. 449
32. Mukoyama M., Nakao K., Hosoda K., Suga S., Saito Y., Ogawa Y., Shirakami G., Jougasaki M. *et al.* Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide, *J Clin Invest.* 1991; **87**, p. 1402-1412

33. D'Souza S., Davis M., Baxter G. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in heart, *Pharmacology & Therapeutics*. 2004; **101**, p. 113-129
34. Potter L., Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation, *J. Biol. Chem.* 2001; **276** (9), p. 6057-6060
35. Kobialka M., Gorczyca W. Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation, *Acta Biochimica Polonica*. 2000; **47** (3), p. 517-528
36. Fenrick R., Bouchard N., McNicoll N., De Lean A. Glycosylation of asparagine 24 of the natriuretic peptide receptor-B is crucial for the formation of a competent ligand binding domain, *Mol Cell Biochem*. 1997; **173**, p. 25-32
37. Heim JM., Singh S., Gerzer R. Effect of glycosylation on cloned ANF-sensitive guanylyl cyclase, *Life Sci*. 1996; **59**, p. PL61-PL68
38. Ledoux J., Werner M., Brayden J., Nelson M. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone, *Physiology*. 2006; **21**, p. 69-78
39. Yang J., Clark J., Bryan R., Robertson C. Mathematical modeling of the nitric oxide/cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; **289**, p. 886-897
40. Maack T., Suzuki M., Almeida F., Nussenzveig D., Scarborough RM., McEnroe GA., Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor, *Science*. 1987; **238**, p. 675-678
41. Anand-Srivastava MB. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation, *Peptides*. 2005; **26**, p. 1044-1059
42. Woodard G., Li X., Rosado J. Water deprivation enhances the inhibitory effect of natriuretic peptides on cAMP synthesis in rat renal glomeruli, *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; **287**, p. F418-F426
43. Woodard G., Li X., Rosado J. Characteristics of the renal C-type natriuretic peptide receptor in hypertrophied and developing rat kidney, *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005; **35**, p. 519-530

44. Anand-Srivastava MB, Srivastava AK., Cantin M. Pertussis toxin attenuated atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylyl cyclase: involvement of Gi guanine nucleotide regulatory protein, *J Biol Chem.* 1987; **262**, p. 4931-4934
45. Anand-Srivastava MB, Sairam MR., Cantin M. Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylyl cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance receptors (C-ANF) to adenylyl cyclase/cAMP signal transduction system, *J Biol Chem.* 1990; **265**, p. 8566-8572
46. Hirata M., Chang CH., Murad F. Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle, *Biochem Biophys Acta.* 1989; **1010**, p. 346-351
47. Sabbatini ME., Villagra A., Davio CA., Valta MS., Fernandez BE., Bianciotti LG. Atrial natriuretic factor stimulates exocrine pancreatic secretion in the rat through NPR-C receptors, *Am J Physiology. Gastrointest Liver Physiol.* 2003; **285**, p. G929-G937
48. Mouawad R., Li Y., Anand-Srivastava MB. Atrial natriuretic peptide-C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signalling activates phosphatidyl inositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells, *Mol Pharmacol.* 2004; **65**, p. 917-924
49. Prins BA., Webder MJ., Hu RM., Daniels M., Levin ER. Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor: potential role in the inhibition of astrocyte proliferation, *J Biol Chem.* 1996; **271**, p. 14156-14162
50. Katafuchi T., Mizuno T., Hagiwara H., Itakura M., Ito T., Hirose S. Modulation by NaCl of atrial natriuretic peptide receptor levels and cyclic GMP responsiveness to atrial natriuretic peptide of cultured vascular endothelial cells, *J Biol Chem.* 1992; **267**, p. 7624-7629
51. Yoshimoto T., Naruse M., Naruse K., Shionoya K., Tanaka M., Tanabe A. Angiotensin II-dependent downregulation of vascular natriuretic peptide type C receptor gene expression in hypertensive rats, *Endocrinology.* 1996; **137**, p. 1102-1107
52. Palaparti A., Anand-Srivastava MB. Angiotensin II modulates ANP-R2/ANP-C receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C, *J Mol Cell Cardiol.* 1998; **30**, p. 1471-1482

53. Anand-Srivastava MB. Downregulation of atrial peptide ANP-C receptor is associated with alterations in G protein expression in A-10 smooth muscle cells, *Biochemistry*. 2000; **39**, p. 6503-6513
54. Kishimoto E., Yoshimasa T., Suga S., Ogawa Y., Komatsu Y., Nakagawa O. Natriuretic peptide clearance receptor is transcriptionally down regulated by beta 2-adrenergic stimulation in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 1994; **269**, p. 28300-28308
55. Sun JZ., Oparil S., Lucchesi P., Thompson JA., Chen YF. Tyrosine kinase receptor activation inhibits NPR-C in lung arterial smooth muscle cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; **281**, p. L155-L163
56. Kishimoto E., Yoshimasa T., Suga S., Ogawa Y., Komatsu Y., Nagakawa O. Natriuretic peptide clearance receptor is transcriptionally down regulated by beta 2-adrenergic stimulation in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*. 1994; **269**, p. 28300-28308
57. Palaparti A., Li Y., Anand-Srivastava MB. Inhibition of atrial natriuretic peptide (ANP) C receptor expression by antisense oligodeoxynucleotides in A10 vascular smooth muscle cells is associated with attenuation of ANP-C receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase, *Biochem J*. 2000; **346**, p. 313-320
58. Matsukawa N., Grzesik WJ., Takahashi N., Pandey KN., Pang S., Yamaguchi M. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; **96**, p. 7403-7408
59. Oliver PM., Fox JE., Kim R., Rockman HA., Kim KS., Reddick RL., Pandey K., Milgram SL. *et al.* Hypertension, cardiac hypertrophy and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; **94**, p. 14730-14735
60. Naruse M., Yoshimoto T., Tanabe A., Naruse K. Pathophysiological significance of the natriuretic peptide system: receptor subtype as another key factor, *Nippon Kakurigaku Zasshi*. 1998; **112**, p. 132-154
61. Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats: relationship to adenylyl cyclase inhibition, *Biochem J*. 1992; **288**, p. 79-85

62. Anand-Srivastava MB. Platelets from spontaneously hypertensive rats exhibit decreased expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein: relation with adenylyl cyclase activity, *Circ Res.* 1993; **73**, p. 1032-1039
63. Marcil J., Schiffrin EL., Anand-Srivastava MB. Aberrant adenylyl cyclase/cAMP signal transduction and G protein levels in platelets from hypertensive patients improve with antihypertensive drug therapy, *Hypertension.* 1996; **28**, p. 83-90
64. Lee J., Kim S., Jung M., Oh Y., Kim SW. Altered expression of vascular natriuretic peptide receptors in experimental hypertensive rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; **29**, p. 299-303
65. Garcia R., Gauquelin G., Cantin M., Schiffrin EL. Angiotensin II downregulates atrial natriuretic factor R₁ and R₂ receptors, *Hypertension.* 1989; **14**, p. 347
66. Lowenstein C., Dinerman J., Snyder S. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger, *Annals of Internal Medicine.* 1994; **120** (3), p. 227-237
67. McDonald LJ., Murad F. Nitric Oxide and cGMP signaling, *Adv Pharmacol.* 1995; **34**, p. 263-275
68. de Leiris J. Biochemistry of free radicals, *Heart & Metabolism.* 2003; **19**, p. 40-44
69. Andrew P., Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases, *Cardiovascular Research.* 1999; **43**, p. 521-531
70. Siddhanta U, Wu C, Abu-Soud HM, Zhang J, Ghosh D, Stuehr DJ. Heme iron reduction and catalysis by nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains, *J Biol Chem.* 1996; **271**, p. 7309-7312
71. Förstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide, *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; **62**, p. 5-12
72. Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases, *Methods Mol Biol.* 1998; **100**, p. 1-32
73. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric oxide synthases, *J Biol Chem.* 2001; **276**, p. 14533-14536

74. Alderton W, Cooper C, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J.* 2001; **357**, p. 593-615
75. Knowles R., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem J.* 1994; **298**, p. 249-258
76. Venema VJ., Ju H., Zou R., Venema RC. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain, *J Biol Chem.* 1997; **272**, p. 28187-28190
77. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; **90**, p. 10769-10772
78. Li H., Wallerath T., Förstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase, *Nitric Oxide.* 2002; **7**, p. 132-147
79. Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes T, Sessa WC. Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells, *J Biol Chem.* 1999; **274**, p. 22524-22531
80. Pollock J, Klinghofer V, Förstermann U, Murad F. Endothelial nitric oxide synthase is myristylated, *FEBS Lett.* 1992; **309**, p. 402-404
81. Oess S, Icking A, Fulton D, Govers R, Müller-Esterl W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases, *Biochem J.* 2006; **396**, p. 401-409
82. Shaul P, Smart E, Robinson L, German Z, Yuhanna I, Ying Y, Anderson R, Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae, *J Biol Chem.* 1996; **271**, p. 6518-6522
83. Shesely E, Maeda N, Kim H, Desai K, Kregge J, Laubach V, Sherman P, Sessa W *et al.* Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; **93** (23), p. 13176-13181
84. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression, *Circulation Research.* 1994; **74**, p. 349-353

85. Boulanger CM, Vanhoutte P. G proteins and endothelium-dependent relaxations, *J Vasc Res.* 1997; **34** (175), p. 185
86. Murthy KS, Teng B, Jin JG, Makhoul GM. G-protein dependent activation of smooth muscle Enos via natriuretic peptide clearance receptor, *Am J Physiol Cell Physiol.* 1998; **275** (6), p. C1409-C1416
87. Kingwell BA. Nitric oxide as a metabolic regulator during exercise: effects of training in health and disease, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000; **27** (4), p. 239-250
88. Bredt D, Hwang P, Snyder S. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, *Nature.* 1990; **347**, p. 768-770
89. Vincent S, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain, *Neuroscience.* 1992; **46**, p. 775-784
90. Govers R, Oess S. To NO or not to NO: 'where?' is the question, *Histol Histopathol.* 2004; **19**, p. 585-605
91. Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L. The plasma membrane calmodulin-dependent calcium-pump: a major regulator of nitric oxide synthase I, *J Cell Biol.* 2001; **155**, p. 201-205
92. MacMicking J, Nathan C, Hom G. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Cell.* 1995; **81**, p. 641-650
93. Schini V, Durante W, Elizondo E, Scott-Burden T, Junquero D, Schafer A. The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF- β 1, PDGFAB and PDGFBB in vascular smooth muscle cells, *Eur J Pharmacol.* 1992; **216**, p. 379-383
94. Navarro-Lerida I, Corvi M, Barrientos A, Gavilanes F, Berthiaume L, Rodriguez-Crespo I. Palmitoylation of inducible nitric-oxide synthase at Cys-3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis, *J Biol Chem.* 2004; **279**, p. 55682-55689

95. Felley-Bosco E, Bender F, Courjault-Gauthier F, Bron C, Quest A. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; **97**, p. 14334-14339
96. Navarro-Lerida I, Portoles M, Barrientos A, Gavilanes F, Bosca L, Rodriguez-Crespo I. Induction of nitric oxide synthase-2 proceeds with the concomitant downregulation of the endogenous caveolin levels, *J Cell Sci*. 2004; **117**, p. 1687-1697
97. Wennmalm A., Benthin G., Edlund A., Jungersten L., Kieler-Jensen N., Lundin S., Westfelt U, Petersson A. *et al.* Metabolism and Excretion of Nitric Oxide in Humans, *Circulation Research*. 1993; **73** (6), p. 1121-1127
98. Lucas K., Pitari G., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik K., Waldman S. Guanylyl cyclases and Signaling by cyclic GMP, *Pharmacol Rev*. 2000; **52**, p. 375-413
99. Wedel B., Humbert P., Harteneck C., Foerster J., Malkewitz J., Bohme E., Schultz G., Koesling D. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; **91**, p. 2592-2596
100. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101** (12), p. 4003-4008
101. Mannick J., Schonhoff C. Nitrosylation: the next phosphorylation?, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002; **408**, p. 1-6
102. Bryan N., Rassaf T., Maloney R., Rodriguez C., Saijo F., Rodriguez J., Feelish M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: An insight into their nature and kinetics *in vivo*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101** (12), p. 4308-4313
103. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998; **356**, p. 1-11
104. Turko I., Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases, *Pharmacol Rev*. 2002; **54**, p. 619-634

105. Cabassi A., Dumont E., Girouard H., Bouchard J., Le Jossec M., Lamontagne D., Besner J., De Champlain J. Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats, *J Hypertens.* 2001; **19**, p. 1233-1244
106. Hemish J., Nakaya N., Mittal V., Enikolopov G. Nitric Oxide Activates Diverse Signaling Pathways to Regulate Gene Expression, *J. Biol. Chem.* 2003; **278** (43), p. 42321-42329
107. Tanner F., Meier P., Greutert H., Champion C., Nabel E., Lüscher T. Nitric Oxide Modulates Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins, *Circulation.* 2000; **101**, p. 1982-1989
108. Fortier A, Polsinelli T, Green S, Nacy C. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: identification of cytokines, effector cells, and effector molecules, *Infect Immun.* 1992; **60**, p. 817-825
109. Alspaugh J, Granger D. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis, *Infect Immun.* 1991; **59**, p. 2291-2296
110. Mauel J, Ransijn A, Buchmuller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives, *J Leukoc Biol.* 1991; **49**, p. 73-82
111. Hibbs JB, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin E. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule, *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; **157**, p. 87-94
112. Croen KD. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication, *J Clin Invest.* 1993; **91**, p. 2446-2452
113. Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan C. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage derived nitric oxide, *J Exp Med.* 1991; **174**, p. 761-768
114. Wink D, Kasprzak K, Maragos C, Elespuru R, Misra M, Dunams T. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors, *Science.* 1991; **254**, p. 1001-1003

115. Uemura Y, Kowall N, Beal M. Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide Y neurons in ischemic gerbil striatum, *Ann Neurol*. 1990; **27**, p. 620-625
116. Blaise G., Gauvin D., Gangal M., Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death, *Toxicology*. 2005; **208**, p. 177-192
117. Jones M., Tsugawa K., Tarnawski A., Baatar D. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1, *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; **318**, p. 520-528
118. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells-implications in cardiovascular disease, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004; **37**, p. 1263-1273
119. Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002; **22**, p. 1655-1661
120. Bagi Z, Koller A. Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type I diabetes is restored by sepiapterin, *Journal of Vascular Research*. 2003; **40**, p. 47-57
121. Landmesser U, Dikalov S, Price S, McCann L, Fukai T, Holland S, Mitch W, Harrison D. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension, *Journal of Clinical Investigation*. 2003; **111**, p. 1201-1209
122. Kunes J, Hojna S, Kadlecova M, Dobesova Z, Rauchova H, Vokurkova M. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency, *Physiol Res*. 2004; **53**, p. 23-34
123. Jennemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y., Lifton R., Williams C., Charru A., Hunt S., Hopkins P. *et al*. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen, *Cell*. 1992; **71**, p. 169-180
124. Jongun L., Sunmi K., Yoonwha O., Sun-Youl R., Soo W. Upregulation of vascular renin-angiotensin and endothelin systems in rats inhibited of nitric oxide synthesis, *Pharmacological Research*. 2002; **46** (5), p. 383-387

125. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB*. 1992; **6**, p. 3051-3064
126. Gewaltig M., Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential, *Cardiovascular Research*. 2002; **55**, p. 250-260
127. Imajo M., Tsuchiya Y, Nishida E. Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways, *IUBMB Life*. 2006; **58** (5-6), p. 312-317
128. Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B., Karandikar M., Berman K., Cobb M. Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions, *Endocrine Reviews*. 2001; **22** (2), p. 153-183
129. Cuscheiri J., Maier R. Mitogen-activated protein kinase (MAPK), *Crit Care Med*. 2005; **33** (12), p. S417-S419
130. Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades, *Biochemical Pharmacology*. 1998; **56**, p. 269-277
131. Force T., Bonventre J. Growth factors and mitogen-activated protein kinases, *Hypertension*. 1998; **31** (2), p. 152-161
132. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity, *Cellular Signalling*. 2001; **13** (2001), p. 777-785
133. Tamemoto H., Kadowaki T., Tobe K., Ueki K., Izumi T., Chatani Y., Kohno M., Kasuga M *et al*. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells, *J Biol Chem*. 1992; **267**, p. 20293-20297
134. Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2, *EMBO*. 2006; **7** (8), p. 782-786
135. Cobb MH., Hepler JE., Cheng M. The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, *Semin Cancer Biol*. 1994; **5**, p. 261-268
136. Seger R., Krebs E. The MAPK signaling cascade, *FASEB*. 1995; **9**, p. 726-735

137. Chu Y., Solski P., Khosravifar R., Der C., Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatase PAC-1, MKP-1 & MKP-2 have unique substrate specificities & reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation, *J Biol Chem.* 1996; **271**, p. 6497-6501

138. Muda M., Boschert U., Dickinson R., Martinou JC., Martinou I, Camps M., Schlegel W., Arkininstall S. MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase, *J Biol Chem.* 1996; **271**, p. 4319-4326

139. Muda M., Boschert U., Smith A., Antonsson B., Gillieron C., Chabert C., Martinou I., Ashworth A. *et al.* Molecular cloning & fonctionnal characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4, *J Biol Chem.* 1997; **272**, p. 5141-5151

140. Hatano N., Mori Y., Oh-hora M., Kosugi A., Fujikawa T., Nakai N., Niwa H., Miyazaki J. *et al.* Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development, *Genes Cells.* 2003; **8**, p. 847-856

141. Belanger LF., Roy S., Tremblay M., Brott B., Steff AM., Mourad W., Hugo P., Erikson R. *et al.* Mek2 is dispensable for mouse growth and development, *Mol Cell Biol.* 2003; **23**, p. 4778-4787

142. Giroux S., Tremblay M., Bernard D., Cardin-Girard JF., Aubry S., Larouche L., Rousseau S., Huot J. *et al.* Embryonic death of Mek-1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta, *Curr Biol.* 1999; **9**, p. 369-372

143. Mazzucchelli C., Vantaggiato C., Ciamei A., Fasano S., Pakhotin P., Krezel W., Welzl H., Wolfer D. *et al.* Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory, *Neuron.* 2002; **34**, p. 807-820

144. Chen Z., Gibson TB., Robinson F. MAP kinases, *Chem Rev.* 2001; **101**, p. 2449-2476

145. Franklin C., Kraft A. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK & stress-activated protein kinase in U937 cells, *J Biol Chem.* 1997; **272**, p. 16917-16923

146. Maekawa M., Yamamoto T., Tanoue T., Yuasa Y., Chisaka O., Nishida E. Requirement of the MAP kinase signaling pathways for mouse preimplantation development, *Development*. 2005; **132**, p. 1773-1783
147. Hirosumi J., Tuncman G., Chang L., Gorgun CZ., Uysal KT., Maeda K., Karin M., Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*. 2002; **420**, p. 333-336
148. Kuan CY., Yang D., Samanta RD., Davis RJ., Rakic P., Flavell RA. The JNK1 & JNK2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development, *Neuron*. 1999; **22**, p. 667-676
149. Enslen H., Brancho DM., Davis RJ. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms, *EMBO J*. 2000; **19**, p. 1301-1311
150. Chao TH., Hayashi M., Tapping RI., Kato Y., Lee JD. MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase I (BMK1) signaling pathway, *J Biol Chem*. 1999; **274** (51), p. 36035-36038
151. Sun W., Kesavan K., Schaefer BC., Garrington TP., Ware M., Johnson NL., Gelfand EW., Johnson GL. MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP & regulates the MEK5-BMI1/ERK5 pathway, *J Biol Chem*. 2001; **276** (1), p. 5093-5100
152. English JM., Pearson G., Baer R., Cobb MH. Identification of substrates & regulators of mitogen-activated protein kinases ERK5 using chimeric protein kinases, *J Biol Chem*. 1998; **273**, p. 3854-3860
153. Takeishi Y., Abe J., Lee JD., Kawakatsu H., Walsh RA., Berk BC. Differential regulation of p90 ribosomal S6 kinase & big mitogen-activated protein kinase 1 by ischemia/reperfusion & oxidative stress in perfused guinea pig hearts, *Circ Res*. 1999; **85** (12), p. 1164-1172
154. Regan CP., Li W., Boucher DM., Spatz S., Su MS., Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; **99**, p. 9248-9253
155. 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, *Journal of Hypertension*. 1999; **17**, p. 907-916
156. Xu Q., Liu Y., Gorospe M., Udelsman R., Holbrook NJ. Acute Hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall, *J Clin Invest*. 1996; **15**, p. 508-514
157. Di Fusco F, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi proteins in non-hypertrophic hearts from rats with hypertension-induced by L-NAME treatment, *Journal of Hypertension*. 2000; **18**, p. 1081-1090
158. Bassil M., Anand-Srivastava MB. Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells, *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; **41**, p. 1162-1173
159. Hashim S., Anand-Srivastava MB. Losartan-induced attenuation of blood pressure in L-NAME hypertensive rats is associated with reversal of the enhanced expression of Gi α proteins, *Journal of Hypertension*. 2004; **22**, p. 181-190
160. Li Y., Hashim S., Anand-Srivastava MB. Angiotensin II-evoked enhanced expression of RGS2 attenuates Gi-mediated adenylyl cyclase signaling in A10 cells, *Cardiovascular Research*. 2005; **66**, p. 503-511
161. Shi-Hai X., Chun-Xiu H., Zhi-Ling Z., Guo-Dong X., Yao D. Significance of platelet activating factor receptor expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis and effects of BN52021, *World J Gastroenterol*. 2007; **13** (21), p. 2992-2998
162. Southam E., Garthwaite J. Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices, *Neurosci Lett*. 1991; **130** (1), p. 107-111
163. Kotamraju S., Matalon S., Matsunaga T., Shang T., Hickman-Davis J., Kalyanaraman B. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells, *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; **40** (2006), p. 1034-1044
164. Glockzin S., von Knethen A., Scheffner M., Brüne B. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome, *J. Biol. Chem*. 1999; **274** (28), p. 19581-19586

165. Kibbe M., Nie S., Seol D., Kovesdi I., Lizonova A., Makaroun M., Billiar T., Tzeng E. Nitric oxide prevents p21 degradation with the ubiquitin-proteasome pathway in vascular smooth muscle cells, *J Vasc Surg.* 2000; **31** (2), p. 364-374
166. Parsons W., Stiles G. Heterologous desensitization of the inhibitory A₁ adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes, *J Biol Chem.* 1987; **262** (2), p. 841-847
167. Moro M., Russell R., Celtek S., Lizasoain I., Su Y., Darley-Usmar V., Radomski M., Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase, *Pharmacology.* 1996; **93** (4), p. 1480-1485
168. Schrammel A., Behrends S., Schmidt K., Koesling D., Mayer B. Characterization of 1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase, *Mol Pharmacol.* 1996; **50**, p. 1-5
169. Zhao Y., Brandish P., DiValentin M., Schelvis J., Babcock G., Marletta M. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ, *Biochemistry.* 2000; **39**, p. 10848-10854
170. Burkhardt M., Glazova M., Gambaryan S., Vollkommer T., Butt E., Bader B., Heermeier K., Lincoln T. *et al.* KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity *in vitro* but not in intact human platelets and rat mesangial cells, *J Biol Chem.* 2000; **275** (43), p. 33536-33541
171. Wanstall JC., Homer KL., Doggrell SA. Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets, *Curr Vasc Pharmacol.* 2005; **3** (1), p. 41-53
172. Ge C., Anand-Srivastava MB. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in AII-mediated enhanced expression of Gi proteins in vascular smooth muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; **251**, p. 570-575
173. Palen DI., Belmadani S., Lucchesi PA., Matrougui K. Role of SHP-1 K.v. 1.2, and cGMP in nitric oxide-induced ERK1/2 MAP kinase dephosphorylation in rat vascular smooth muscle cells, *Cardiovascular Research.* 2005; **68** (2), p. 268-277

174. Yoshioka Y., Yamamuro A., Maeda S. Nitric oxide/cGMP signaling pathway protects RAW264 cells against nitric oxide-induced apoptosis by inhibiting the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, *Pharmacol Sci.* 2006; **101** (2), p. 126-134

175. Lander H., Jacovina A., Davis R., Tauras J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species, *J Biol Chem.* 1996; **271** (33), p. 19705-19709

176. Oliveira C., Schindler F., Ventura A., Morais M., Arai R., Debbas V. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells, *Free Radical Biology and Medicine.* 2003; **35** (4), p. 381-396

177. Kim S., Xu YJ., Katz S., Pelech S. Cyclic GMP-dependent and -independent regulation of MAP kinases by sodium nitroprusside in isolated cardiomyocytes, *Biochem Biophys Acta.* 2000; **1496**, p. 277-284

178. Jope RS., Zhang L., Song L. Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2000; **376** (2), p. 365-370

179. Rousell J., Haddad E., Lindsay M., Barnes P. Regulation of m2 muscarinic receptor gene expression by platelet-derived growth factor: involvement of extracellular signal-regulated protein kinases in the down-regulation process, *Mol Pharmacol.* 1997; **52**, p. 966-973

180. Lania A., Persani L., Ballaré E., Mantovani S., Losa M., Spada A. Constitutively active Gs α is associated with an increased phosphodiesterase activity in human growth hormone-secreting adenomas, *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; **83** (5), p. 1624-1628

181. Aizawa T., Wei H., Miano J., Abe J., Berk B., Chen Y. Role of phosphodiesterase 3 in NO/cGMP-mediated anti-inflammatory effects in VSMC, *Circulation Research.* 2003; **93** (5), p. 406-413

182. Busch C., Liu H., Graveline A., Bloch K. Nitric oxide induces phosphodiesterase 4B expression in rat pulmonary artery smooth muscle cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; **290**, p. L747-L753

183. Fenteany G., Standaert RF., Lane W., Choi S., Corey E., Schreiber S. Inhibition of proteasome activities & subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin, *Science*. 1995; **268** (5211), p. 726-731

