

**Université de Montréal**

**Magda Descorbeth**

**Département de physiologie**

**Faculté de Médecine**

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

**Philosophia Doctor (Ph.D.)**

**Janvier 2009**

**©Magda Descorbeth, 2009**

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Modulation de la voie de signalisation de Gαq  
par l'hyperglycémie : mécanisme moléculaire**

Présentée par :

Magda Descorbeth

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Rémy Sauvé, président rapporteur

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava, directrice de recherche

Dr. Jean St-Louis, membre du jury

Dr. Ghassan Bkaily, examinateur externe

Dr. Réjean Couture, représentant de la FES

*À ma famille,  
mes parents, Vilna et Vénus,  
mes deux frères, Widens et Mathieu  
ma belle sœur et ma nièce, Uveda et Terri-Lee  
pour leur amour inépuisable, leur soutien et leur confiance en  
moi*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Dieu, l'Éternel des armées, de m'avoir donné la santé, la force et l'intelligence pour avoir réalisé mes études doctorales.

J'aimerais remercier profondément ma directrice de recherche Madhu B. Anand-Srivastava, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je la remercie pour la formation scientifique qu'elle m'a offerte, pour sa supervision, ses encouragements, sa patience et sa confiance en moi. J'aimerais remercier sincèrement Dr. Rémy Sauvé, Dr. Jean S-Louis et Dr. Ghassan Bkaily pour avoir accepté d'évaluer ma thèse de doctorat.

Je tiens aussi à remercier Dr. Yuan Li pour ses conseils précieux, son soutien technique et scientifique. J'aimerais chaleureusement remercier mes collègues de laboratoire et amis, Maria, Somo, Marcel, Georgios, Ingrid, Louis-Olivier, Yessica, Jasmine, Marielle et Nathan pour l'atmosphère amicale et l'esprit d'équipe qu'ils m'ont offert durant mes études. Merci à tous les membres du département de physiologie, incluant professeurs, étudiants, assistants de recherches et secrétaires, plus particulièrement à Christiane, Johanne et Claude pour leur aide et leur support.

De plus, je voudrais remercier mes amis, qui m'ont encouragée, aidée, supportée et qui ont toujours été présents dans les moments difficiles. Guerda, Maryse, Farah, Ginelle, Jackson et Joy, un grand MERCI !

Finalement, je remercie les organismes tels que la Société Québécoise d'hypertension artérielle (SQHA), la faculté des études supérieures (FES), la société canadienne d'hypertension artérielle (CHS), l'association de diabète canadien (CDA) et à la société d'hypertension européenne qui m'ont offert des bourses de voyage et des prix d'excellences. Le support financier de ce travail a été assuré par les subventions de recherche de l'Institut de recherche en santé du Canada (IRSC) pour Dr. Madhu B. Anand-Srivastava.

## Abstract

Vascular complications including increased contractility and cell proliferation are most common complications in diabetes, and chronic hyperglycemia seem to be an important contributing factor in this process.  $Gq\alpha$  signaling pathway plays an important role in the regulation of vascular tone and aberration of these mechanisms may contribute to vascular complications in hyperglycemia/diabetes. The levels and activity of protein kinase C (PKC) and diacylglycerol (DAG) were shown to be up-regulated in diabetes/hyperglycemia. In addition, studies on the expression of upstream signaling molecules of phosphatidyl inositol (PI) turnover were lacking. The enhanced activity/levels of protein PKC and DAG induced by high glucose in VSMC have been shown to be attributed to the increased oxidative stress. Furthermore, the levels of various vasoactive peptides including Ang II and ET-1 which are augmented in diabetes and under hyperglycemic conditions, may also contribute to the enhanced oxidative stress in diabetes/hyperglycemia. The work presented in this thesis was therefore undertaken to examine if hyperglycemia/diabetes could also modulate the expression of  $Gq\alpha$  and phospholipase  $C\beta$  ( $PLC\beta$ ) proteins and associated PI turnover signaling in A10 VSMC exposed to high glucose and to explore the molecular mechanisms by which high glucose modulates  $Gq\alpha/PLC$  signaling.

The first study was undertaken to investigate if hyperglycemia can modulate the expression of  $Gq\alpha$ ,  $G11\alpha$ ,  $PLC\beta$ -1 and  $PLC\beta$ -2 and associated signaling. Pre-treatment of A10 VSMC with high glucose (26 mM) for 3 days augmented the levels of  $Gq\alpha$ ,  $G11\alpha$ ,  $PLC\beta$ -1 and  $\beta$ -2 proteins as compared to control cells which were restored to control levels by endothelin-1 (ET-1)  $ET_A$  and  $ET_B$  and angiotensin II (Ang II)  $AT_1$  receptor antagonists. In addition, ET-1-stimulated  $IP_3$  formation was also significantly higher in VSMC exposed to high glucose. Furthermore, treatment of A10 VSMC with Ang II and ET-1 also increased significantly the levels of  $Gq/11\alpha$  and  $PLC\beta$  proteins

which were restored towards control levels by ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and AT<sub>1</sub> receptor antagonists. These results suggest that high glucose augmented the expression of Gq/11 $\alpha$ , PLC $\beta$  and -mediated signaling in VSMC which may be attributed to activation of AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors.

The second study was undertaken to investigate the implication of oxidative stress in high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta_{1/2}$  proteins and associated signaling in A10 VSMC and to explore the mechanism responsible for high glucose induced enhanced oxidative stress. We showed that the increased levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins in A10 VSMCs exposed to high glucose were restored to control levels by the antioxidant diphenyleneiodonium (DPI), and catalase, a scavenger of hydrogen peroxide, but not by <sup>111</sup>Mn-tetralis(benzoic acid porphyrin) (MnTBAP) and uric acid, scavengers of peroxynitrite. In addition, endothelin-1 (ET-1)-stimulated production of IP<sub>3</sub> that was enhanced by high glucose was also restored towards control levels by DPI and catalase. These results suggest that high glucose-induced enhanced oxidative stress that contributes to the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  protein and signaling. Furthermore, the enhanced production of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), NADPH oxidase activity and enhanced expression of p22<sup>(phox)</sup> and p47<sup>(phox)</sup> proteins induced by high glucose was restored to control levels by losartan, BQ123 and BQ788, the antagonists of angiotensin AT<sub>1</sub> and endothelin-1 ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors respectively. These results suggest that high glucose-induced enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1, by increasing oxidative stress may contribute to the increased levels of Gq/11 $\alpha$  and-mediated signaling in A10 VSMC.

Since high glucose has been shown to increase growth factor receptor activation, we investigated, in the third study, the role of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) transactivation in high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ . The increased levels of

Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins induced by high glucose were restored to control levels by AG1478, an inhibitor of EGF-R, and AG1295, an inhibitor of PDGF-R as well as by PP2, an inhibitor of c-Src. High glucose-induced increased phosphorylation of EGF-R and PDGF-R which were abolished by AG1478, AG1295 and PP2. High glucose-induced enhanced levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  and PLC $\beta$  were also attenuated by PD98059, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase (MAPK), and wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). In addition, high glucose-induced enhanced phosphorylation of ERK1/2 and AKT was also attenuated by AG1478 and AG1295. These results suggest that c-Src-induced transactivation of growth factor receptor contributes to the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$ /PLC and-mediated cell signaling through MAPK/PI3K pathway.

In conclusion, the studies presented in this thesis indicate that hyperglycemia increased the levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ 1/2 proteins and mediated signaling. We provided evidence that high glucose-induced increased levels of Ang II and ET-1 may contribute to the enhanced production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and results in enhanced oxidative stress which may be responsible for the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ . Finally, we demonstrated that high glucose-induced transactivation of growth factor receptors may also be responsible for the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ <sub>1/2</sub>.

**Keywords:** High glucose; Gq $\alpha$  protein; PLC $\beta$ ; PI turnover; Vascular smooth muscle cells; Oxidative stress; Growth factor receptor; cSrc; MAPK; AKT.

## Résumé

Les complications vasculaires telles que l'augmentation de la contractilité et la prolifération cellulaire sont les complications les plus communes observées dans le diabète et l'hyperglycémie chronique est un facteur important dans ces processus. La voie de signalisation de  $G\alpha_q$  joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire et l'altération de celle-ci peut contribuer aux complications vasculaires observées dans les cas de diabète et d'hyperglycémie. Il a été observé que les taux et l'activité des protéines kinase C (PKC) et du diacylglycérol (DAG) sont augmentés dans ces conditions. Cependant, aucune étude n'a démontré l'implication de  $G\alpha_q/11$  et des  $PLC\beta$ , molécules de signalisation en amont de PKC/DAG. Plusieurs études révèlent que l'augmentation des taux et de l'activité des PKC et du DAG induite par l'hyperglycémie dans des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) est attribuée à l'augmentation du stress oxydatif. De plus, les niveaux de certains peptides vasoactifs, tels que l'angiotensine II et l'endothéline-1, augmentés dans les conditions de diabète/d'hyperglycémie, peuvent contribuer à l'augmentation du stress oxydatif observée. Le travail présenté dans cette thèse avait pour but d'examiner les effets de l'hyperglycémie sur les niveaux d'expression protéique de  $G\alpha_q/11$  et de ses molécules associées, ainsi que d'étudier le mécanisme moléculaire par lequel l'hyperglycémie module la voie de signalisation de  $G\alpha_q$  dans les CMLV.

Dans la première étude, nous avons examiné si l'hyperglycémie pouvait moduler l'expression des protéines  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $PLC\beta_1$  et  $PLC\beta_2$ . Le prétraitement des CMLV A10 avec 26 mM de glucose durant 72 heures augmente l'expression des protéines  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{11}$ ,  $PLC\beta_1$  et  $PLC\beta_2$  en comparaison avec les CMLV témoins. Le traitement avec des antagonistes aux récepteurs  $AT_1$  de l'Ang II, et  $ET_A/ET_B$  de l'ET-1, atténue la hausse de  $G\alpha_q$ , de  $G\alpha_{11}$ , de  $PLC\beta_1$  et de  $PLC\beta_2$  induite par l'hyperglycémie. De plus, la formation d' $IP_3$  stimulée par l'ET-1 était plus élevée dans les CMLV exposée à 26



mM de glucose. Le traitement des CMLV A10 avec l'Ang II et l'ET-1 augmente également les niveaux d'expression des protéines  $G\alpha q/11$  et  $PLC\beta$ . Cette augmentation de l'expression est restaurée au niveau des CMLV témoins par les antagonistes des récepteurs  $AT_1$ ,  $ET_A$  et  $ET_B$ . Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression des protéines  $G\alpha q/11$  et  $PLC\beta$  dans les CMLV induite par l'hyperglycémie est attribuée à l'activation des récepteurs  $AT_1$ ,  $ET_A$  et  $ET_B$ .

Dans la seconde étude, nous avons examiné l'implication du stress oxydatif dans l'augmentation des niveaux d'expression des protéines  $G\alpha q/11$  et  $PLC\beta$  et de leur signalisation induite par l'hyperglycémie. Nous avons également déterminé le mécanisme responsable de l'augmentation du stress oxydatif induite par l'hyperglycémie. L'augmentation de l'expression des protéines  $G\alpha q/11$  et  $PLC\beta$  des CMLV A10 exposées à 26 mM de glucose est revenue au niveau basal après un traitement avec l'antioxydant diphenyleneiodonium (DPI), et la catalase, un chélateur du peroxyde d'hydrogène, mais pas par le  $^{111}\text{Mn}$ -tetralis(benzoic acid porphyrin) (MnTBAP) ni par l'acide urique, des chélateurs du peroxyde d'azote. De plus, l'augmentation de la formation d' $IP_3$  stimulée par l'ET-1 dans les CMLV exposées à 26 mM de glucose est revenue au niveau basal après un traitement avec le DPI et la catalase. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du stress oxydatif induite par l'hyperglycémie contribue à l'augmentation de l'expression des protéines  $G\alpha q/11$  et les molécules associées à la voie de signalisation de Gq. De plus, l'augmentation de la production d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), de l'activité de la NADPH oxydase et de l'expression des protéines  $p22^{(phox)}$  et  $p47^{(phox)}$  induite par l'hyperglycémie est revenue à un niveau basal après un traitement avec les antagonistes des récepteurs  $AT_1$ ,  $ET_A$  et  $ET_B$ . Ces résultats suggèrent que l'hyperglycémie augmente les niveaux endogènes de l'Ang II et de l'ET-1, ce qui augmente le stress oxydatif par la formation d' $O_2^-$  et de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et peut contribuer à l'augmentation des niveaux de Gq/11α et de leurs molécules de signalisation.

Puisqu'il a été observé que l'hyperglycémie transactive les récepteurs aux facteurs de croissance tels que le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF-R) et le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-R), nous avons entrepris d'examiner, dans la troisième étude, l'implication d'EGF-R et de PDGF-R dans l'augmentation des niveaux de Gαq/11, de PLCβ et de leur signalisation induite par l'hyperglycémie. L'augmentation des niveaux d'expression des protéines Gαq, Gα11, PLCβ-1 et PLCβ-2 induite par l'hyperglycémie est revenue au niveau basal après un traitement avec les inhibiteurs d'EGF-R (AG1478) et de PDGF-R (AG1295) et par l'inhibiteur de c-Src, PP2. L'augmentation de la phosphorylation d'EGF-R et de PDGF-R induite par l'hyperglycémie a été abolie par AG1478, AG1295 et PP2. De plus, l'augmentation des niveaux de Gαq/11, et de PLCβ induite par l'hyperglycémie est atténuée par l'inhibiteur des MAPK, le PD98059, et par l'inhibiteur d'AKT, le wortmannin. L'augmentation de la phosphorylation d'ERK et d'AKT était également atténuée par AG1478 et AG1295. Ces résultats suggèrent que la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance induite par c-Src peut contribuer à l'augmentation des niveaux de Gαq/11/PLC et de leur signalisation par la voie des MAPK/PI3K.

En conclusion, les études présentées dans cette thèse indiquent que l'hyperglycémie augmente les niveaux de Gαq/11 et de PLCβ. Nous avons émis des évidences qui démontrent que l'augmentation endogène de l'Ang II et de l'ET-1 par l'hyperglycémie peut contribuer à l'augmentation de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> résultant ainsi en une augmentation du stress oxydatif qui pourrait être responsable de l'augmentation de Gαq/11/PLC et de leur signalisation dans les conditions d'hyperglycémie. Finalement, nous avons démontré que la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance induite par l'hyperglycémie peut être responsable

de l'augmentation de  $G\alpha_q/11/PLC$  et les molécules associées à la voie de signalisation de Gq dans les cas de diabète et d'hyperglycémie.

**Mots clefs:** Hyperglycémie; protéine  $G\alpha_q$ ;  $PLC\beta$ ; cycle PI; cellules du muscle lisse vasculaire; Stress oxydatif; récepteurs aux facteurs de croissance; cSrc; MAPK; AKT.

## Table des matières

Dédicace.....	iii
Remerciements.....	iv
Abstract.....	v
Résumé.....	viii
Table des matières.....	xii
Liste des figures.....	xviii
Liste des tableaux.....	xxii
Liste des abréviations.....	xxiii
<b>Chapitre 1.....</b>	<b>1</b>
Introduction et revue de littérature.....	1
<b>1. Le diabète.....</b>	<b>2</b>
1.1.Régulation de la glycémie.....	3
1.2. Un modèle animal de diabète de type 1 : Rat diabétique à la streptozotocine (STZ).....	4
<b>2. Signalisation transmembranaire par des récepteurs couplés aux protéines G.....</b>	<b>5</b>
2.1 Généralités.....	5
2.2 Le système de l'adénylate cyclase/AMPC.....	6
2.3 Voie de signalisation des phospholipides inositols ou voie de signalisation de Gαq.....	7
2.3.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	9
2.3.1.1 Structure des RCPG.....	9
2.3.2 Les protéines G.....	11

2.3.2.1 Structure et classification des protéines G.....	11
2.3.2.2 Activation et inactivation des protéines G $\alpha$ .....	13
2.3.3 Phospholipase C $\beta$ (PLC $\beta$ ).....	15
2.3.3.1 Structure et fonction des PLC $\beta$ .....	15
Activation de la PLC $\beta$ par la sous-unité G $\alpha_q$ .....	17
Activation de la PLC $\beta$ par le complexe G $\beta\gamma$ .....	17
2.3.4 Diacylglycérol et PKC.....	18
2.3.4.1 Structure et fonctions du diacylglycérol.....	18
2.3.4.2 Formation du diacylglycérol.....	18
2.3.4.3 Inhibition du diacylglycérol.....	19
2.3.5 Structure et classification des protéines kinase C.....	19
2.3.5.1 Cibles biologiques des PKC.....	20
2.3.6 IP $_3$ et calcium.....	21
2.4 Rôles physiologiques et pathologiques de la voie de signalisation de G $\alpha_q$ dans le système cardiovasculaire.....	24
2.4.1 Altération de la voie de signalisation de G $\alpha_q$ dans le diabète et l'hyperglycémie.....	25
<b>3. Le stress oxydatif.....</b>	<b>26</b>
3.1 Métabolisme des espèces réactives oxygénées.....	27
3.2 Source cellulaire de production au niveau vasculaire des ERO.....	28
3.3 La NAD(P)H oxydase.....	29
3.3.1 Structure de NAD(P)H oxydase.....	29
3.3.2 NAD(P)H oxydase au niveau vasculaire.....	30
3.4 Activation de la NAD(P)H oxydase par les récepteurs couplés aux protéines G.....	32
Stimulation de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II et l'ET-1.....	32

3.5 Élimination des espèces réactives oxygénées.....	33
3.5.1 Superoxyde dismutase.....	34
3.5.2 Glutathion Peroxydase.....	35
3.5.3 Catalase.....	35
3.6 Rôles physiologiques des espèces réactives oxygénées.....	35
3.7 Les molécules de signalisations ciblées par les espèces réactives oxygénées.....	36
Facteurs de transcriptions.....	36
Protéines tyrosines phosphatases et protéine kinases.....	37
MAP kinases.....	38
Transport calcique.....	39
3.8 Implication des espèces réactives oxygénées dans le dommage vasculaire.....	39
3.9 Implication du stress oxydatif dans le diabète et l'hyperglycémie.....	40
Production des espèces réactives oxygénées par l'hyperglycémie.....	42
<b>4. Les peptides vasoactifs.....</b>	<b>42</b>
4.1 Endothéline-1.....	42
4.1.1 Production de l'Endothéline-1.....	43
4.1.2 Les récepteurs de l'ET-1.....	44
4.1.3 Le récepteur ET <sub>A</sub> .....	45
4.1.4 Le récepteur ET <sub>B</sub> .....	45
4.1.5 Mécanisme de signalisation des récepteurs de l'ET-1.....	46
4.2 Angiotensine II.....	48
4.2.1 Production d'Angiotensine II.....	49
4.2.2 Les récepteurs de l'Ang II.....	50
4.2.3 Mécanisme de signalisation des récepteurs AT <sub>1</sub> .....	51
Voie de signalisation couplée à une protéine G.....	52

Voie de signalisation non-couplée à une protéine G .....	54
4.3 L'ET-1 et l'Ang II dans le diabète et l'hyperglycémie.....	55
<b>5. Récepteurs aux facteurs de croissance.....</b>	<b>56</b>
5.1 Récepteurs au facteur de croissance épidermique.....	56
5.2 Récepteurs au facteur de croissance dérivé des plaquettes.....	57
5.3 Mécanisme de signalisation des récepteurs EGF-R et de PDGF-R.....	58
La voie de ras-MAPK.....	58
La voie de PI3K-AKT.....	59
La voie de PLC $\gamma$ .....	59
La voie de c-Src.....	59
5.4 EGF-R et PDGF-R dans le diabète et l'hyperglycémie.....	61
<b>Chapitre II.....</b>	<b>63</b>
Hypothèse et objectifs de travail.....	64
<b>Chapitre 3.....</b>	<b>66</b>
<b>High glucose increases the expression of Gq/11 and PLC<math>\beta</math> proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells.....</b>	<b>67</b>
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Materials and methods.....	71
Results.....	75
Discussion.....	79
References.....	84
Figure legends.....	90
Figures.....	93
<b>Chapitre 4.....</b>	<b>101</b>

<b>Redox modulation of high glucose-induced increased expression of Gq/11<math>\alpha</math> proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells</b> .....	102
Abstract.....	103
Introduction.....	104
Materials and methods.....	107
Results.....	110
Discussion.....	115
References.....	120
Figure legends.....	128
Figures.....	132
<b>Chapitre 5</b> .....	141
<b>Role of Growth factor receptor transactivation in high glucose-induced increased expression of Gq/11<math>\alpha</math> and associated signaling in vascular smooth muscle cells</b> .....	142
Abstract.....	143
Introduction.....	144
Materials and methods.....	146
Results.....	149
Discussion.....	153
References.....	158
Figure legends.....	162
Figures.....	166
<b>CHAPITRE 6</b> .....	175
<b>Discussion générale</b> .....	176
Conclusion générale.....	187



Perspectives.....189

Source Bibliographique.....191

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1 : Voie d'activation et d'inhibition de l'adénylate cyclase/AMPC par les protéines Gas et Gai.....	7
Figure 2 : Voie de signalisation de Gq $\alpha$ .....	9
Figure 3 : Structure d'un récepteur couplé à une protéine G.....	11
Figure 4 : Représentation du cycle d'activation et d'inactivation des protéines G.....	15
Figure 5 : Structure de la phospholipase C $\beta$ .....	17
Figure 6 : Structure de la NADPH oxydase.....	30
Figure 7 : Voies de production et voies d'élimination des ERO.....	4
Figure 8 : Biosynthèse de l'endothéline-1.....	44
Figure 9 : Voie de signalisation des récepteurs de l'ET-1.....	48
Figure 10 : Schéma du système rénine-angiotensine vasculaire.....	50
Figure 11 : Voie de signalisation des récepteurs de l'Ang II couplée à une protéine G.....	53
Figure 12 : Voie de signalisation des récepteurs de l'Ang II non-couplée à une protéine G.....	55
Figure 13 : Voies de signalisation de PDGF-R et d'EGF-R.....	61
Figure 14 : Mécanismes moléculaires suggérés dans l'augmentation de la voie de signalisation de Gq $\alpha$ /PLC induite par l'hyperglycémie.....	188

### Chapitre 3

Figure 1: The expression of G $_{q\alpha}$ and phospholipase C- $\beta$ (PLC- $\beta$ ) proteins in aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) from streptozotocin (STZ)-diabetic rats.....	93
--	----

Figure 2: Effect of high glucose on the expression of G <sub>q</sub> /11 $\alpha$ proteins in A10 VSMCs.....	94
Figure 3: Effect of high glucose on the expression of PLC- $\beta$ isoforms in A10 VSMCs.....	95
Figure 4: Effect of high glucose on endothelin-1 (ET-1)-induced inositol triphosphate (IP <sub>3</sub> ) formation in A10 VSMCs.....	96
Figure 5: Effect of endothelin types <i>A</i> and <i>B</i> (ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> ) and Ang II type 1 (AT <sub>1</sub> ) receptor antagonists on high glucose-induced enhanced expression of G <sub>q</sub> $\alpha$ , G11 $\alpha$ , and PLC- $\beta$ proteins in A10 VSMCs.....	97
Figure 6: Effect of ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> and AT <sub>1</sub> receptor antagonists on ET-1 and Ang II-induced enhanced expression of G <sub>q</sub> $\alpha$ and G11 $\alpha$ protein in A10 VSMCs.....	98
Figure 7: Effect of ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> and AT <sub>1</sub> receptor antagonists on ET-1 and Ang II-induced enhanced expression of PLC- $\beta$ <sub>1</sub> and PLC- $\beta$ <sub>2</sub> protein in A10 VSMCs.....	99
Figure 8: Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which hyperglycemia/diabetes increase the expression of G <sub>q</sub> $\alpha$ /PLC $\beta$ proteins and result in vascular complications.....	100

#### **Chapitre 4**

Figure 1: Effect of diphenyleiiodonium (DPI) on the expression of G <sub>q</sub> /11 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	132
Figure 2: (A,B) Effect of diphenyleiiodonium (DPI) on the expression of PLC $\beta$ <sub>1/2</sub> proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	133
Figure 2: (4C) Effect of diphenyleiiodonium (DPI) on ET-1-induced augmentation of IP <sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	133

Figure 3: Effect of catalase, MnTBAP and uric acid on the expression of Gq/11 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	134
Figure 4: Effect of catalase, MnTBAP and uric acid on the expression of PLC $\beta$ proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	135
Figure 5: Effect of catalase on ET-1-induced augmentation of IP $_3$ in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	136
Figure 6: Effect of high glucose on the expression of SOD proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	137
Figure 7: Effect of AT $_1$ and ET $_A$ /ET $_B$ receptor antagonists on high-glucose induced O $_2^-$ production in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	138
Figure 8: Effect of AT $_1$ and ET $_A$ /ET $_B$ receptor antagonists on the expression of p22 <sup>(phox)</sup> and p47 <sup>(phox)</sup> subunits proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	139
Figure 9: Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which hyperglycemia/diabetes increases the expression of Gq/11 $\alpha$ and-mediated cell signaling.....	140

## **Chapitre 5**

Figure 1: Effect of growth factor inhibitors on the expression of Gq/11 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	166
Figure 2: Effect of Growth factor inhibitors on the expression of PLC $\beta$ 1/2 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	167

Figure 3: Effect of PP2 on the expression of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ and PLC $\beta$ proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).....	168
Figure 4: Effect of growth factor and c-Src inhibitor on ET-1-induced augmentation of IP <sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	169
Figure 5: Effect of growth factor inhibitors and c-Src inhibitor on the activation of EGFR and PDGFR in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	170
Figure 6: Effect of PD 98059 and wortmanin on the expression of Gq/11 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	171
Figure 7: Effect of PD 98059 and wortmanin on the expression of PLC $\beta$ 1/2 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	172
Figure 8: Effect of Growth factor receptor inhibitors on the activation of ERK/AKT proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.....	173
Figure 9: Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which hyperglycemia/diabetes increases the expression of Gq/11 $\alpha$ and-mediated cell signaling.....	174

**Liste des tableaux**

Tableau 1 : Les différentes familles de protéines G.....	13
--	----

## Liste des abréviations

AA : l'acide arachidonique

AC : adénylate cyclase

ACE : enzyme de conversion à l'angiotensine

ADAM : activation des disintégrines et des métalloprotéinases

Ang II : angiotensine II

AP : acide phosphatidique

AP-1 : protéine activateur 1

AGE : produits de glycation avancée

ASK : kinase régulant le signal apoptotique

Ca<sup>2+</sup> : calcium

Cav-1 : cavéoline-1

CMLV : cellules du muscle lisse vasculaire

COX : cyclooxygénase

CT : toxine de choléra

DAG : diacylglycérol

DGK : diacylglycérol kinase

DGAT : diacylglycerol acyltransférase

DID : diabète insulino-dépendant

DNID : diabète non-insulino-dépendant

EET : acide epoxyeicosatriénoïque

EGF : facteur de croissance épidermique

EGF-R : récepteur de facteur de croissance épidermique

EDRF : facteur relaxant dérivé de l'endothélium

eNOS : NO synthase endothéliale

ERO : espèces réactives oxygénées

ERK1/2 : «*extracellular signal-regulated kinase 1/2*»

ET : endothéline

ET-1 : endothéline-1

FAK : kinases d'adhésion focale

GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase

GPX : glutathione peroxydase

Grb2: protéine de liaison de facteurs de croissances 2

HB-EGF : facteur de croissance épidermal liant l'héparine

HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HOCl : acide hypochlorique

HSP : protéine de choc thermique

I<sub>CRAC</sub>: «*Ca<sup>2+</sup> release activated Ca<sup>2+</sup> current*»

IGF : facteur de croissance apparenté à l'insuline

IP<sub>1</sub>: inositol 4-phosphate

IP<sub>2</sub> : inositol 1-4-biphosphate

IP<sub>3</sub>: l'inositol 1,4,5-triphosphate

IP3R : récepteurs à l'IP<sub>3</sub>

JAK : kinase de la famille janus

JNK : kinase N-terminale c-jun

LO : lipooxygénases

LT : leukotriènes

LPA : formation d'acide lysophatidique

LPAAT : lysophosphatidate acyltransférase

MAPK : protéine activateur de mitogène kinase



MEK: «*mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase*»

MKP-1 : MAP Kinase phosphatase-1

MLC : chaîne légère de myosine

MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine

MLV : muscle lisse vasculaire

MMP : métalloprotéinases matricielles

NADPH oxydase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NFκB: facteur nucléaire κB

NO: monoxyde d'azote

NOD: souris non-obèses diabétiques

NOOO-: peroxydenitrite

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion super oxide

OAG: oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

OH<sup>-</sup>: radical hydroxyde

PC: phosphatidylcholine

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDGF-R : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PKC-1,3 : kinase dépendante des phosphoinositides-1.

PE : phényléphrine

PG : prostaglandines

PGI<sub>2</sub> : prostacycline

PH : régions d'homologie avec p130cas

PI : phosphatidylinositol

PI3K : phosphatidylinositol 3-Kinase

PI(4,5)P<sub>2</sub> : inositol biphosphates

PIP<sub>2</sub> : inositol biphosphates

PKA : protéines kinases de type A  
PKC : protéines kinases de type C  
PKB : protéine kinase de type B  
PLA2 : phospholipase A<sub>2</sub>  
PLD : phospholipase D  
PLC $\gamma$  : phospholipase  $\gamma$   
PLC $\beta$  : phospholipases C $\beta$   
PPH : phosphohydrolase acide phosphatidique  
PT : toxine pertussis  
PTB : région liant les tyrosines phosphorylées  
PTK : protéines tyrosines kinases  
PTP : protéines tyrosines phosphatases  
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G  
RAS : système rénine-angiotensine  
rat BB : rat «*Bio Breeding*»  
RE : réticulum endoplasmique  
ROC : canaux récepteurs dépendants  
SH2 : régions d'homologie avec Src  
SHR : rat spontanément hypertendu  
SOD : superoxyde dismutase  
SOS: «*Son Of Sevenless*»  
SOC : «*store-operated channels*»  
SRA : système rénine-angiotensine  
STZ : streptozotocine  
TAG : triacylglycérol  
TRP : canaux ioniques potentiels récepteurs transitoires

Trx : thiorédoxine

TxA2 : thromboxane A<sub>2</sub>

# **CHAPITRE 1**

**INTRODUCTION**

**ET**

**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## 1. Le diabète

Le diabète méllitus est un syndrome d'altération du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, dû à une sécrétion insuffisante d'insuline ou à une perte de sensibilité des tissus à l'insuline. Il existe deux types distincts de diabètes : le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant (DID) attribuable à un défaut de sécrétion d'insuline et le diabète de type 2 ou diabète non-insulino-dépendant (DNID) imputable à une perte de sensibilité des tissus cibles aux effets métaboliques de l'insuline. Cette perte de sensibilité à l'insuline est communément appelée insulino-résistance (Guyton and Hall, 2000). Dans ces deux types de diabète, le métabolisme du glucose est altéré, ce qui empêche une consommation et une utilisation efficace du glucose par la majeure partie des cellules de l'organisme. Il en résulte une élévation de la glycémie, une importante diminution de l'utilisation du glucose par les cellules, alors que l'utilisation des graisses et des protéines augmente (Guyton and Hall, 2000).

Le diabète méllitus est l'un des facteurs qui contribuent aux maladies cardiovasculaires (Cooper *et al.*, 2001). Par exemple, au niveau de la microvascularisation, le diabète engendre la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie, alors qu'au niveau de la macrovascularisation, il engendre une augmentation des lésions athérosclérotiques et une augmentation des thromboses (Kannel and McGee, 1979; Kessler, 1971). L'hyperglycémie est la conséquence immédiate du diabète. Cette dernière semble jouer un rôle important dans les complications cardiovasculaires observées dans le diabète (Srivastava., 2002). Dans le cas de diabète et d'hyperglycémie chronique, les facteurs les plus communs et les plus importants dans les complications vasculaires sont l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'altération de la contractilité des vaisseaux sanguins (Hashim *et al.*, 2006).

## 1.1. Régulation de la glycémie

Chez un sujet normal, la concentration du glucose dans le sang se situe entre 80 et 90 mg/100ml (4.5 à 5.5 mM) à jeun. La concentration augmente jusqu'à 120 à 140 mg/100ml (6.6 à 7.7 mM) après un repas, mais dans les deux heures suivant la prise de glucides, des dispositifs de rétroaction ramènent la concentration de glucose du sang à son niveau normal (Guyton and Hall, 2000). La régulation des niveaux du glucose dans le sang se fait à l'aide de deux hormones qui sont sécrétées par les îlots de Langerhans localisés au niveau du pancréas : le glucagon et l'insuline (Guyton and Hall, 2000; Marieb, 1993). L'insuline a été isolée et identifiée en 1922 par Banting et Best. L'insuline est une petite protéine de 51 acides aminés constituée de deux chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures (Sanger and Tuppy., 1951, Sanger and Thompson 1953a,b; Haist, 1971). Elle est tout d'abord synthétisée dans les cellules bêta des îlots de Langerhans, sous la forme d'une pré-pro-hormone. Elle est ensuite scindée pour former la pro-insuline puis clivée pour former l'insuline (Steiner and Oyer, 1967; Haist, 1971; Guyton and Hall, 2000; Marieb, 1993). Le glucagon, par contre, est un polypeptide qui est sécrété par les cellules alpha des îlots de Langerhans (Kimball and Murlin, 1923). Le glucagon, formé d'une chaîne de 29 acides aminés (Bromer *et al.*, 1957), est un agent hyperglycémiant extrêmement puissant (Guyton and Hall, 2000; Marieb, 1993).

Lorsque la glycémie s'élève, il y a synthèse et libération de l'insuline, par le pancréas. L'insuline cause la capture, le stockage et l'utilisation rapide du glucose par la plupart des tissus de l'organisme, plus particulièrement par les muscles et le foie où il est stocké sous la forme de glycogène, et dans le tissu adipeux sous la forme de triglycérides (Guyton and Hall, 2000). Inversement, la baisse de la glycémie entraîne la sécrétion du glucagon qui agit en sens inverse de l'insuline pour faire remonter la glycémie à son niveau normal. Les deux principaux effets du glucagon sont la scission

du glycogène hépatique (la glycogénolyse) et la néoglucogenèse hépatique. Ces deux effets se conjuguent pour augmenter fortement le niveau de glucose sanguin. La plupart des autres effets du glucagon ont lieu seulement quand sa concentration dans le sang est excessive. Par exemple, il active la lipase des cellules adipeuses qui engendre de plus grandes quantités d'acides gras disponibles pour les besoins énergétiques de l'organisme (Guyton and Hall, 2000).

## **1.2. Un modèle animal de diabète de type 1 : Rat traité à la streptozotocine (STZ)**

Chez les animaux, le diabète de type 1 peut être induit soit génétiquement ou expérimentalement. Par exemple, les rats BB «*Bio Breeding rat*» (Nakhooda *et al.*, 1977) et les souris non- obèses diabétiques (NOD) (Harada and Makino, 1984) sont deux modèles animaux spontanément diabétiques de type 1 qui présentent les caractéristiques de la pathologie humaine des diabétiques de type 1 (Nakhooda *et al.*, 1978; Yale and Marliss, 1984; Leiter, 1989; Filippi *et al.*, 2009). Par contre, il existe également des modèles d'animaux de diabète de type 1 induit par des substances chimiques. Ces composés détruisent spécifiquement les cellules  $\beta$  du pancréas, ce qui amène une baisse de production de l'insuline. L'une des substances chimiques les plus utilisées est la streptozotocine. À forte dose, elle détruit les cellules  $\beta$  (Wang *et al.*, 1993) alors qu'à de faibles doses administrées de façon répétées, elle induit la destruction des cellules  $\beta$  par un mécanisme immunitaire dépendant des cellules T (Lukic *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993; Lukic *et al.*, 1998; Weiss, 1982). Des études ont révélé que la surexpression de la protéine G inhibitrice (G $\alpha$ i) améliore l'état des rats rendus diabétiques par un traitement à la streptozotocine (rats STZ), ce qui suggère l'implication des protéines G dans la pathologie du diabète (Zheng *et al.*, 1998). Les rats STZ ont présenté une altération de l'expression et de la fonction des protéines G $\alpha$ i au niveau de l'aorte (Hashim *et al.*, 2002). De plus, Harris et ses collaborateurs ont observé, dans un modèle de rat STZ, que la voie de signalisation de G $\alpha$ q avait un rôle

dans la cardiomyopathie, pathologie cardiaque que l'on retrouve dans ce modèle (Harris *et al.*, 2004). Chez le rat STZ il semble que le diabète altère l'expression des protéines G et leur fonction. La notion des protéines G et leur fonction sera détaillée plus en profondeur ci-dessous.

## **2. Signalisation transmembranaire par des récepteurs couplés aux protéines G**

### **2.1 Généralités**

Chaque cellule d'un animal multicellulaire répond à un ensemble spécifique de signaux extracellulaires produits par d'autres cellules. Ces signaux agissent pour réguler le comportement de la cellule. La signalisation cellulaire ne requiert pas seulement des molécules de signalisations extracellulaires, mais aussi un ensemble complémentaire de récepteurs protéiques qui permet à la cellule de lier ces signaux extracellulaires et d'initier une signalisation dans laquelle des médiateurs locaux sont produits. Cependant, la plupart des molécules de signalisation extracellulaires sont hydrophiles et ne peuvent activer les récepteurs protéiques qu'à la surface de la cellule cible. Ces récepteurs agissent comme des transducteurs de signaux, transmettant des signaux biochimiques extracellulaires à des effecteurs intracellulaires qui modifient le comportement de la cellule cible (Alberts *et al.*, 2002).

Il y a trois principales familles de récepteurs transmembranaires qui effectuent la transduction des signaux extracellulaires. Premièrement, les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques à ouverture contrôlée qui s'ouvrent ou se ferment rapidement en réponse à la liaison d'un neurotransmetteur (Taylor-Clark and Udem, 2006; Alberts *et al.*, 2002). Deuxièmement, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des récepteurs qui, par l'intermédiaire des protéines hétérotrimériques de liaison au GTP (protéine G), activent ou inactivent indirectement des enzymes liées à la membrane plasmique ou des canaux ioniques. Troisièmement, les récepteurs couplés aux enzymes



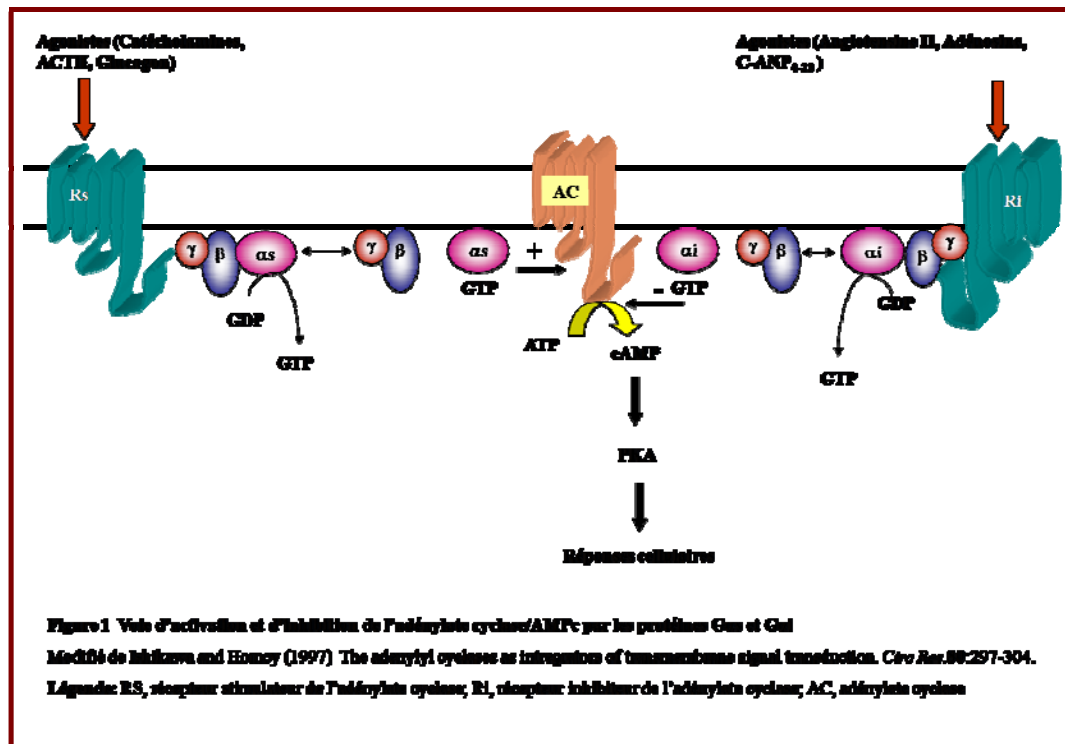
sont des récepteurs qui agissent directement comme des enzymes ou qui sont associés à celles-ci. Ces enzymes sont généralement des protéines kinases qui phosphorylent des protéines spécifiques dans la cellule cible (Alberts *et al.*, 2002).

Plusieurs mécanismes de signalisation tels que le système phosphoinositide/ $\text{Ca}^{2+}$ /protéine kinase C, le système de l'adénylate cyclase/AMPC (mécanismes induits par les RCPG), la voie des MAP Kinases (MAPK) et la voie d'AKT/PI3K (mécanismes induits par les récepteurs couplés à une activité enzymatique) sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire et de la prolifération cellulaire (Hashim *et al.*, 2006). L'altération de ces mécanismes contribue certainement aux complications vasculaires observées dans le diabète et l'hyperglycémie (Hashim *et al.*, 2006). Dans le cadre de cette thèse, les mécanismes de signalisation initiés par les RCPG et par les récepteurs couplés aux enzymes seront discutés et approfondis. De façon générale, la signalisation activée par les RCPG fonctionne de la manière suivante : un signal externe active un récepteur situé à la membrane plasmique qui, à son tour, stimule une protéine G qui active un effecteur qui, ensuite, amène la production des seconds messagers (Collins *et al.*, 1992; Alberts *et al.*, 2002).

## **2.2 Le système de l'adénylate cyclase/AMPC**

Le système de l'adénylate cyclase/AMPC est un mécanisme de signalisation produite par les RCPG. Ce mécanisme de signalisation est composé de trois éléments : un récepteur, une protéine G (Gi, Gs) et une protéine effectrice (AC) (Hashim *et al.*, 2006). La voie de l'adénylate cyclase/AMPC est stimulée par la protéine Gas et inhibée par la protéine Gai (Alberts *et al.*, 2002). Cette voie est activée de la façon suivante : un agoniste, se liant au récepteur membranaire, active la protéine Gas en permettant l'échange du GDP pour le GTP. La protéine Gas activée stimule l'AC permettant ainsi la formation du messenger second, l'AMPC, qui active la protéine kinase A (PKA) (Offermanns, 2003). La PKA, une fois activée, donne lieu à plusieurs réponses

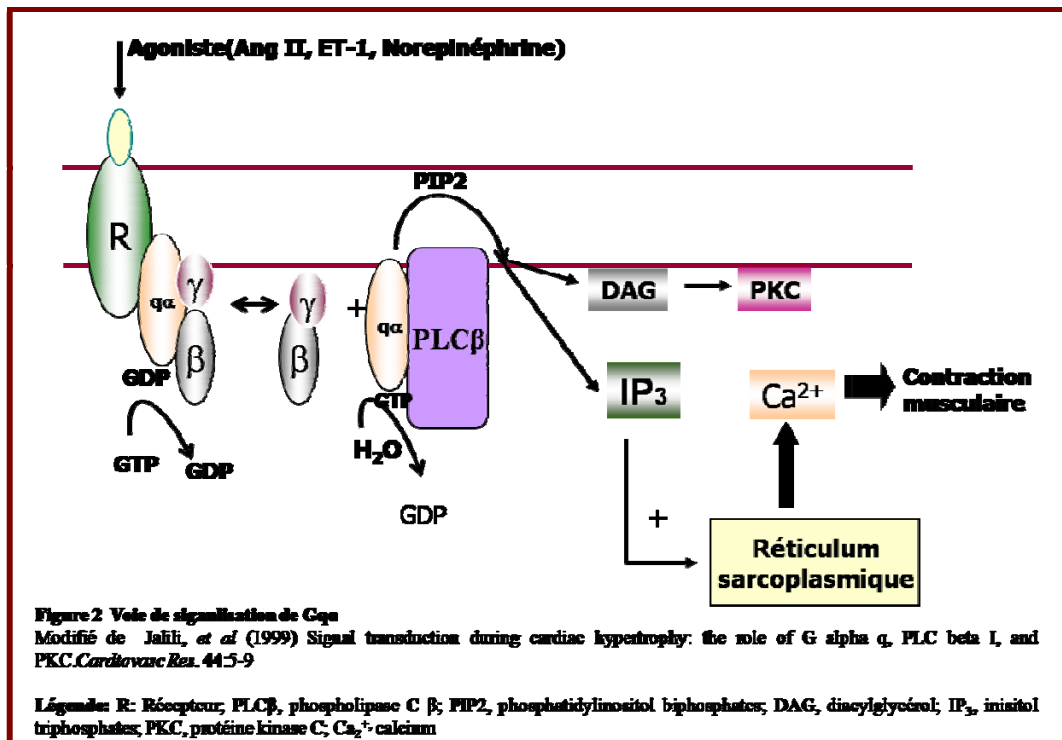
physiologiques telles que la vasorelaxation (Lincoln, 2007) et la dégradation du glycogène (Alberts *et al.*, 2002). Cependant, lorsqu'un ligand se lie à un récepteur qui est couplé à une protéine G $\alpha_i$ , l'activation de la protéine G $\alpha_i$  inhibe l'AC, amenant une diminution de la production d'AMPc et de l'activation de PKA (figure 1) (Alberts *et al.*, 2002).



### 2.3 Voie de signalisation des phospholipides inositols ou voie de signalisation de G $\alpha_q$

La voie de signalisation des phospholipides inositol, également appelée voie de signalisation de G $\alpha_q$ , est un autre des mécanismes de signalisation les mieux caractérisés. Cette voie de signalisation est également composée de trois éléments : un récepteur, une protéine régulatrice liant le GTP (protéine G) et une protéine effectrice (Berridge, 1993). Chaque élément de cette cascade joue un rôle important dans la transmission du signal extracellulaire et dans le bon fonctionnement cellulaire. Les

récepteurs qui suivent la voie de signalisation des phospholipides inositol activent principalement la protéine Gαq qui active, à son tour, les phospholipases Cβ (PLCβ) (Alberts *et al.*, 2002). Les PLCβ activées hydrolysent l'inositol biphosphates (PI(4,5)P<sub>2</sub>) en deux seconds messagers intracellulaires, l'inositol 1,4,5-triphosphates (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> est une petite molécule hydrosoluble qui quitte la membrane plasmique, diffuse à travers le cytosol, puis se lie sur son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique (RE) afin de permettre la relâche du calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire (Irvine, 1990; Alberts *et al.*, 2002). De son côté, le DAG reste encastré dans la membrane où il a deux rôles potentiels de signalisation. Premièrement, il peut être hydrolysé afin de libérer de l'acide arachidonique (AA) qui agit comme messenger, ou servir à la synthèse d'autres petits messagers lipidiques tels que les eïcosanoïdes (Alberts *et al.*, 2002). La deuxième fonction du DAG, la plus importante, est d'activer des kinases de type sérine-thréonine, les protéines kinases de type C (PKC). Une fois activées, les PKC phosphorylent des protéines cibles qui varient selon le type cellulaire (Alberts *et al.*, 2002) (figure 2). Dans le cadre de cette thèse, la voie de signalisation de Gαq sera discutée plus en détail.



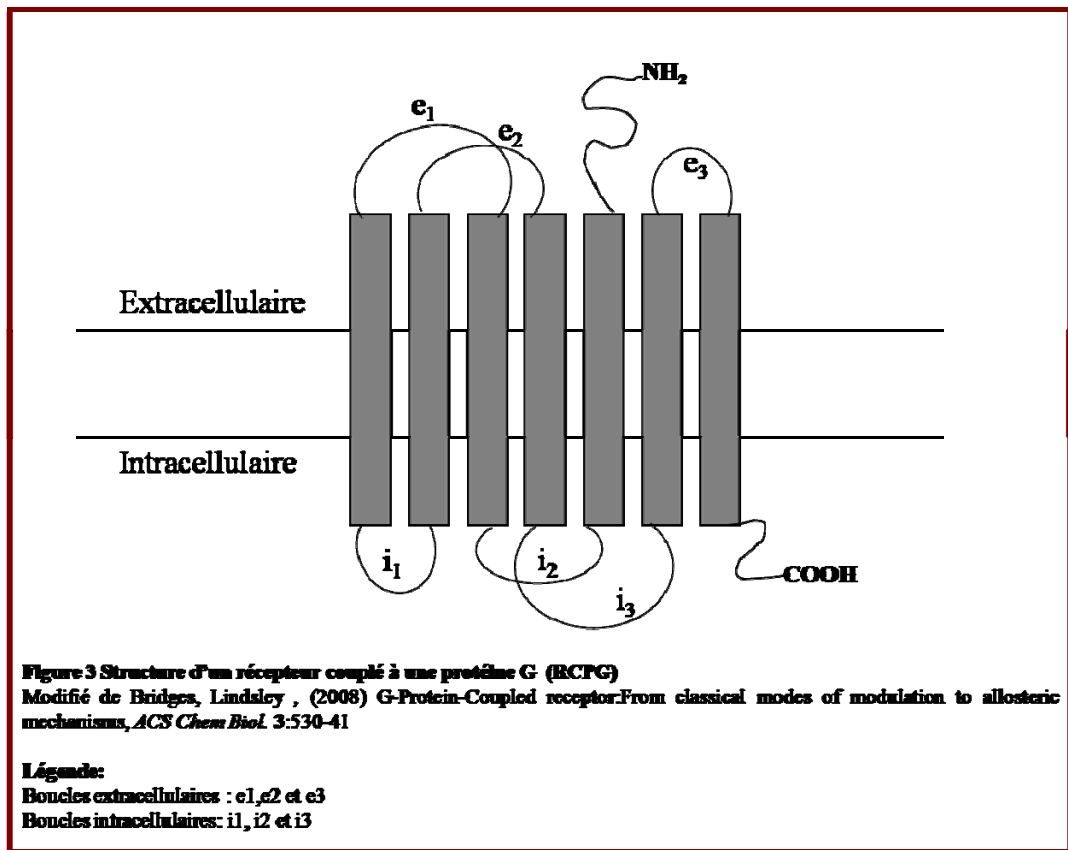
### 2.3.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

#### 2.3.1.1 Structure des RCPG:

Les récepteurs couplés aux protéines G forment la plus grande famille de récepteurs transmembranaires retrouvée chez les eucaryotes (Tang and Insel, 2004; Alberts *et al.*, 2002). Les RCPG permettent de fournir des réponses à une immense diversité de molécules de signalisation, dont des hormones, des neurotransmetteurs (Alberts *et al.*, 2002). Les molécules de signalisation qui activent les RCPG ont de structures et de fonctions variées : on y trouve des protéines et des petits peptides, ainsi que des dérivés d'acides aminés et d'acides gras (Alberts *et al.*, 2002; Hermans, 2003). Dans le système cardiovasculaire, les RCPG jouent un rôle important dans la régulation du rythme cardiaque, de la contractilité et du tonus vasculaire (Hendriks-Balk *et al.*, 2008). Il y a plus de 100 différents RCPG qui sont exprimés dans le système cardiovasculaire (Tang and Insel, 2004). Parmi eux, on retrouve les récepteurs de l'Ang II, de l'ET-1, de la bradykinine et de la vasopressine (Tang and Insel, 2004). Les RCPG forment une grande famille qui possède sept hélices transmembranaires d'une longueur

d'environ 24 acides aminés chacune (Bridges and Lindsley, 2008) et qui sont connectées entre elles par trois boucles extracellulaires ( $e_1$ - $e_3$ ) et trois boucles intracellulaires ( $i_1$ - $i_3$ ) (Bridges and Lindsley, 2008) (figure 3). Les boucles extracellulaires contiennent deux résidus de cystéines hautement conservés qui forment des ponts disulfures. Ces ponts stabilisent la structure du récepteur. De plus, les RCPG ont une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (Bridges and Lindsley, 2008).

Le RCPG transfère le signal extracellulaire au travers de la membrane plasmique vers la protéine G. Les ligands interagissent avec la partie extracellulaire du RCPG, spécialement avec la queue N-terminale qui est généralement large pour ces récepteurs (Bockaert and Pin, 1999; Gether, 2000; Kristiansen, 2004). La liaison de l'agoniste amène un changement de conformation du RCPG permettant à la protéine G d'interagir avec le RCPG (Cabrera-Vera *et al.*, 2003; Kristiansen, 2004). Cette interaction se fait avec la seconde et la troisième boucle intracellulaire et la queue C-terminale de ce récepteur (Gether, 2000; Wess, 1997; Wess, 1998).



## 2.3.2 Les protéines G

### 2.3.2.1 Structure et classification des protéines G

Les protéines de liaison au GTP (protéines G) sont encrées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique où elles servent de molécules de relais entre les récepteurs et les protéines intracellulaires (Alberts *et al.*, 2002). Les protéines G sont composées de trois sous-unités protéiques,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Gilman *et al.*, 1984; Gilman *et al.*, 1987; Alberts *et al.*, 2002). La sous-unité  $\alpha$  possède une activité GTPase intrinsèque, c'est-à-dire qu'elle catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP (Fields and Casey, 1997). Dans les cellules de mammifères, il existe divers isoformes pour chaque sous-unité, environ 20 pour la sous-unité  $\alpha$ , cinq pour la sous-unité  $\beta$  et dix pour la sous-unité  $\gamma$  (Cali *et al.*, 1992; Hepler and Gilman, 1992; Ray *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1994).

Les protéines G sont classifiées selon l'identité de leur sous-unité  $\alpha$  (Tableau 1) (Bridges and Lindsley, 2008). Elles sont divisées en quatre familles majeures, Gs, Gi,

Gq et G<sub>12</sub> (Neer, 1995). La famille Gs est composée des protéines G<sub>as</sub> et de G<sub>OLF</sub>. Ces isoformes, sensibles à la toxine de choléra (CT) (Gill and Meren, 1978; Offermanns, 2003), stimulent l'activité de l'adénylate cyclase (AC) résultant en la formation d'AMPc qui peut alors activer une protéine kinase A (PKA) (Jalili *et al.*, 1999). C'est pourquoi on les nomme Gs pour protéine G stimulatrice (Alberts *et al.*, 2002). La famille Gi, dont les membres sont sensibles à la toxine pertussis (PT) (Gilman, 1987; Offermanns, 2003), est constituée de trois isoformes ubiquitaires G<sub>ai</sub>-1, G<sub>ai</sub>-2 et G<sub>ai</sub>-3 (Ithoh *et al.*, 1988; Robishaw *et al.*, 1988), deux isoformes rétinien Gat-1 et Gat-2 et de deux isoformes cervicales G<sub>ao</sub>-A et G<sub>ao</sub>-B (Hollmann *et al.*, 2005). On nomme cette famille Gi pour protéine G inhibitrice puisqu'elles inhibent l'AC (Alberts *et al.*, 2002). La famille insensible au PT, la famille Gq, est formée de G<sub>aq</sub>, G<sub>α11</sub>, G<sub>α14</sub>, G<sub>α15</sub> et G<sub>α16</sub> (Hollmann *et al.*, 2005). Les membres de cette famille stimulent la PLCβ amenant à la formation d'IP<sub>3</sub> et du DAG suivi par une augmentation du calcium intracellulaire et de l'activation des PKC (Hendriks-Balk *et al.*, 2008). La famille G12 est constituée de G<sub>α12</sub> et G<sub>α13</sub> (Hollmann *et al.*, 2005). Bien qu'exprimé d'une manière ubiquitaire, la fonction biologique des membres de cette famille est très peu connue (Dhanasekaran and Dermott, 1996; Strathmann and Simon, 1991). Au niveau cellulaire, il serait possible qu'ils soient impliqués dans la régulation de la voie de signalisation de la kinase N-terminale c-jun (JNK, pour c-Jun N-terminal kinase) (Prasad *et al.*, 1995), de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> et de la petite protéine G RhoA (Buhl *et al.*, 1995; Dhanasekaran *et al.*, 1994; Hooley *et al.*, 1996).

Protéine G $\alpha$	Poids moléculaire (kDa)	Rôle
<b>G<math>\beta</math></b>		
G $\alpha$ <sub>s</sub>	42, 45, 47, 52	↑ AC
G $\alpha$ <sub>olf</sub>	46	↑ AC
<b>G<math>\beta</math></b>		
G $\alpha$ <sub>i1</sub>	41	↓ AC/↑ canaux K <sup>+</sup>
G $\alpha$ <sub>i2</sub>	40	↓ AC/↑ canaux K <sup>+</sup>
G $\alpha$ <sub>i3</sub>	41	↓ AC/↑ canaux K <sup>+</sup>
G $\alpha$ <sub>oA</sub>	39	↑ canaux K <sup>+</sup>
G $\alpha$ <sub>oB</sub>	39	↑ canaux K <sup>+</sup>
<b>G<math>\beta</math></b>		
G $\alpha$ <sub>q</sub>	42	↑ PLC
G $\alpha$ <sub>11</sub>	43	↑ PLC
G $\alpha$ <sub>14</sub>	43	↑ PLC
G $\alpha$ <sub>15</sub>	43	↑ PLC
G $\alpha$ <sub>16</sub>	43	↑ PLC
<b>G<math>\beta</math></b>		
G $\alpha$ <sub>12</sub>	44	↑ Rho
G $\alpha$ <sub>13</sub>	44	↑ Rho

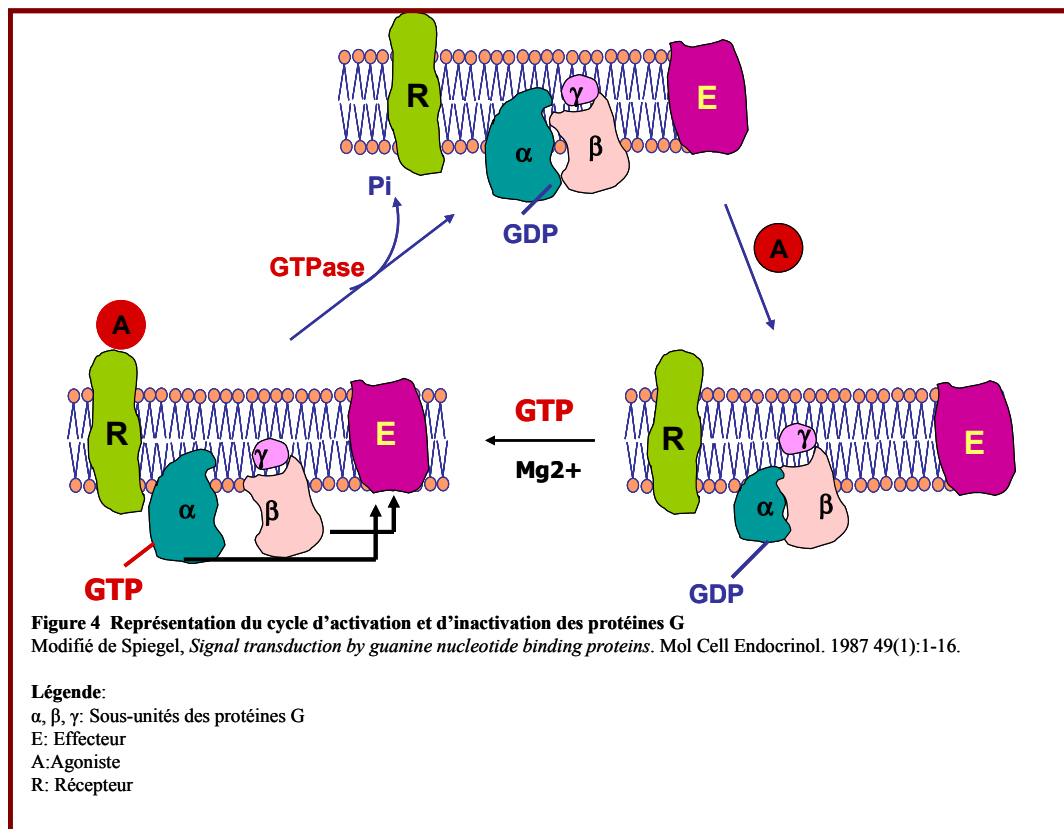
**Tableau 1 Les différentes familles de protéines G**

### 2.3.2.2 Activation et inactivation des protéines G $\alpha$

Quand le GDP est lié à la sous-unité  $\alpha$ , cette dernière est alors associée avec le complexe  $\beta\gamma$ , formant un hétérotrimère inactif lié au récepteur (Neer, 2005). La sous-



unité  $\alpha$  et le complexe  $\beta\gamma$  peuvent tout deux liés le récepteur. Le monomère  $\alpha$ , lié au GDP, peut interagir avec le récepteur, mais cette association est beaucoup plus grande en présence des sous-unités  $\beta\gamma$  (Neer, 2005). Lorsqu'un ligand stimule un RCPG, ce dernier devient activé et subit un changement de conformation (Neer, 2005; Hollmann *et al.*, 2005). La sous-unité  $\alpha$ , lié au GDP, subit aussi un changement de conformation qui diminue son affinité pour le GDP et ce GDP se détache et libère le site actif de la sous-unité  $\alpha$ . Puisque la concentration intracellulaire du GTP est plus élevée que celle du GDP, le GTP prendra alors la place du GDP (Neer, 1995). Une fois que le GTP est lié à la sous-unité  $\alpha$ , cette dernière se dissocie du récepteur et du complexe  $\beta\gamma$ . Ces composants peuvent agir avec différents effecteurs qui modulent la production et l'activation de molécules solubles intracellulaires, les seconds messagers (Birnbaumer, 1992; Hepler and Gilman, 1992; Neer, 1995). L'état actif à cette sous-unité  $\alpha$  demeure jusqu'à ce que le GTP se fasse hydrolyser en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$  (Spiegel, 1987; Neer, 1995). Quand le GTP est clivé formant un GDP et un phosphate inorganique (Pi), la sous-unité  $\alpha$  se réassocie avec le dimère  $\beta\gamma$ , ceux-ci redeviennent inactive et se réassocient au récepteur en attente d'une prochaine activation (Spigel, 1987; Neer, 1995) (Figure 4).



### 2.3.3 Phospholipase Cβ (PLCβ)

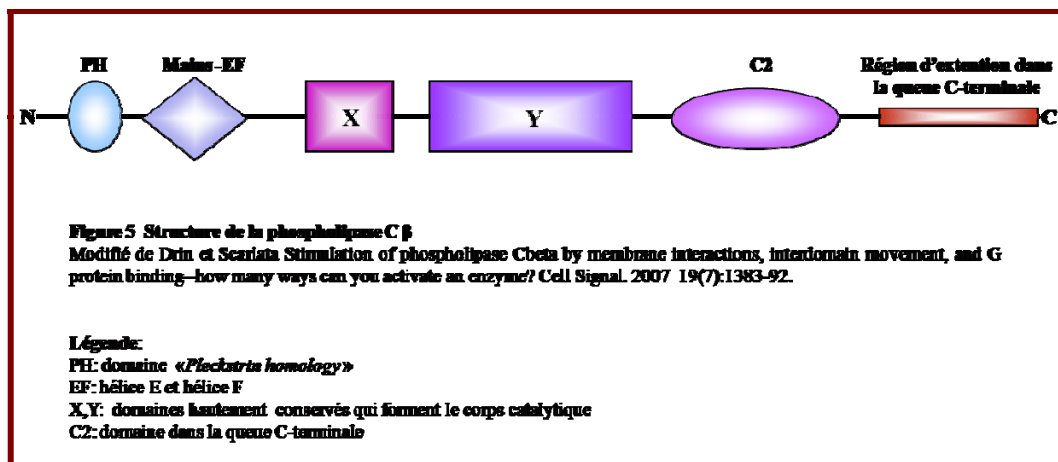
#### 2.3.3.1 Structure et fonction des PLCβ

Les phospholipases C (PLC) sont des enzymes spécifiques aux phosphoinositides qui dépendent du  $\text{Ca}^{2+}$  et qui catalysent l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> en DAG et IP<sub>3</sub>, deux importants seconds messagers (Drin and Scarlata, 2007). La première évidence que les PLC avaient une activité fut suggérée par Hokin et ses collaborateurs en 1953. Ils avaient observé qu'une hydrolyse spécifique de phospholipides dans le pancréas de pigeon avait lieu suite à une stimulation cholinergique (Hokin and Hokin, 1953). Les PLC sont des protéines solubles ayant de multiples domaines dont les poids moléculaires varient entre 85 et 150 kDa (Rebecchi and Pentylala, 2000). Chez le mammifère, il existe 13 isoformes de PLC qui sont séparées en six familles; β, γ (Patterson *et al.*, 2005), δ, ε (Bunney and Katan, 2006), ζ (Swann *et al.*, 2006), et η (Zhou *et al.*, 2005). Chaque famille comprend plusieurs isoformes et ils se diffèrent

entre eux par l'organisation structurale, la régulation, l'activation et la distribution tissulaire (Drin and Scarlata, 2007).

Les PLC $\beta$  sont les principaux effecteurs de la famille Gq (Drin and Scarlata, 2007). Il existe quatre types de PLC $\beta$ ; PLC $\beta$ -1, PLC $\beta$ -2, PLC $\beta$ -3 et PLC $\beta$ -4 (Jalili *et al.*, 1999) dont les poids moléculaires varient entre 120 et 155 kDa (Rhee, 2001). Tous les membres de la famille Gq activent les PLC $\beta$ , cependant ils n'activent pas les PLC $\gamma$ , PLC $\delta$  ou PLC $\epsilon$  (Lopez *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 1991; Smrcka *et al.*, 1991). La PLC $\beta$ -1 est exprimée majoritairement dans le cœur (Schnabel *et al.*, 1996), alors que la PLC $\beta$ -3 est exprimée dans tous les tissus (Meij, 1996). La PLC $\beta$ -2 a été retrouvée au niveau du muscle lisse, du tissu neuronal et du foie (LaBelle and Polyak, 1996). La PLC $\beta$ -4 semble être exprimée uniquement au niveau de la rétine (Lee *et al.*, 1994) et dans des aires spécifiques du cerveau (Roustan *et al.*, 1995).

Les PLC $\beta$  contiennent des composantes structurales similaires aux autres membres de la famille PLC (figure 5). Ils possèdent deux domaines hautement conservés (X et Y) qui forment le corps catalytique (Rhee *et al.*, 1989; Rhee and Bae, 1997). De plus, ils possèdent également des motifs de mains EF qui lient les ions Ca<sup>2+</sup>. Ils sont constitués également de deux régions formant des liaisons phospholipide-membrane : le domaine PH, localisés dans la queue N-terminale, et le domaine C2 (Suh *et al.*, 2008). Cependant, les PLC $\beta$  se distinguent des autres PLC par la présence d'un long segment en C-terminale constitué d'environ 450 résidus qui contient plusieurs déterminants pour l'interaction avec les protéines G $\alpha$ q et également pour d'autres fonctions telles que la liaison membranaire et la localisation nucléaire (Drin and Scarlata, 2007; Faenza *et al.*, 2008; Rebecchi and Pentylala, 2000; Rhee, 2001).



### *Activation de la PLCβ par la sous-unité Gαq*

Les membres de la famille Gαq stimulent les PLCβ dans l'ordre d'affinité suivant :  $\beta-1 \geq \beta-3 > \beta-2$  (Jhon *et al.*, 1993; Smrcka and Sternweis, 1993). La sous-unité Gαq activée interagit avec la région COOH-terminale de la PLCβ. Cette région contient le domaine C2 situé entre les résidus 663-802 suivis par une séquence de résidus 803-1216. Des études de délétion suggèrent que le résidu 845 au niveau des PLCβ est nécessaire pour sa liaison et la stimulation par Gαq (Park *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). De plus, les résidus basiques localisés dans les séquences des résidus 663-802 et 1055-1075 sont également importants pour la stimulation des PLCβ par Gαq (Kim *et al.*, 1996).

### *Activation de la PLCβ par le complexe Gβγ*

À l'exception de la PLCβ-4, toutes les PLCβ sont activées par le dimère βγ (Camps *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1993; Smrcka and Sternweis, 1993). La sensibilité des PLCβ pour le complexe βγ diffère de celle pour la sous-unité Gαq (Camps *et al.*, 1992; Smrcka and Sternweis, 1993). Des études de liaison ont montré que le dimère βγ interagit avec la PLCβ-1 et la PLCβ-3, mais a une plus grande affinité pour la PLCβ-2 (Runnels and Scarlata, 1999). Donc, la sous-unité αq et le dimère βγ contribuent à l'activation des PLCβ au niveau des cellules (Rhee, 2001).

## 2.3.4 Diacylglycérol et PKC

### 2.3.4.1 Structure et fonctions du diacylglycérol

L'hydrolyse de PIP2 par les PLC $\beta$ , comme mentionné ci-dessus, génère la formation d'un messager second lipidique, le DAG. Le DAG est un lipide simple constitué d'une molécule de glycérol liée à une chaîne d'acide gras à la position *Sn*2, via une liaison ester, et à une seconde chaîne d'acide gras à la position *Sn*, par une liaison d'ester ou ether alkenyl (Cook, 1991). Les chaînes d'acide gras peuvent être poly-insaturées, di-insaturées, mono-insaturées ou saturées, générant ainsi diverses espèces de DAG (Hodgkin *et al.*, 1998; Wakelam, 1998). Les DAG saturés sont généralement des activateurs faibles des PKC. Les DAG di-insaturés sont plus actifs, alors que les DAG polyinsaturés, tels que le DAG 1-stearoyl-2-arachidononyl, sont des puissants activateurs des PKC (Marignani *et al.*, 1996; Schachter *et al.*, 1996).

Le DAG interagit avec différentes protéines par leur domaine C1. Ce domaine consiste en une séquence conservatrice de cinquante acides aminés portant le motif HX<sub>11-12</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>12-14</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>HX<sub>2</sub>CX<sub>6-7</sub>C (Yang and Kazanietz, 2003). Il existe deux types de domaine C1, le typique et l' atypique (Hurley *et al.*, 1997). Parmi les protéines qui contiennent le domaine C1, on retrouve la diacylglycérole kinase (DGK) (l'inhibiteur du DAG) et les PKC (les effecteurs les plus importants du DAG).

### 2.3.4.2 Formation du diacylglycérol

Le DAG peut provenir de diverses sources. Premièrement, le mécanisme principal par lequel le DAG est généré (Wright and McMaster, 2002) est l'hydrolyse de l'inositol biphosphates par les PLC $\beta$ , les PLC $\gamma$ , les PLC $\delta$  et les PLC $\epsilon$  (Brose *et al.*, 2004) lorsque ces PLC sont activées par les RCPG, les récepteurs tyrosines kinases, le calcium et les Ras, respectivement (Rhee, 2001). Deuxièmement, le DAG peut être produit suite à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) par la phospholipase D (PLD) (Timmers *et al.*, 2008).

Cependant, dans le cas d'une résistance à l'insuline induite par l'augmentation des lipides, le DAG est formé à la suite d'estérification de deux acyl-CoAs à longue chaîne sur un glycérol-3-phosphate (Timmers *et al.*, 2008). La première étape d'acylation est catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT), résultant à la formation d'acide lysophatidique (LPA). La seconde étape d'acylation est catalysée par la lysophosphatidate acyltransférase (LPAAT) pour former un second précurseur, l'acide phosphatidique (AP) (Timmers *et al.*, 2008). Ce dernier est par la suite transformé en DAG par la phosphohydrolase acide phosphatidique (PPH). Par l'action de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT), le DAG peut être transformé en triacylglycérol (TAG) (Carrasco and Merida, 2007). L'hydrolyse de TAG par des lipases résulte également à une augmentation des niveaux du DAG (Timmers *et al.*, 2008).

#### **2.3.4.3 Inhibition du diacylglycérol**

Il existe plusieurs mécanismes pour inhiber la production du DAG : la phosphorylation du DAG par la DGK pour produire AP, l'hydrolyse du DAG par la lipase produisant des monoacylglycérols et des acides gras libres, la conversion du DAG en PC ou en triglycérides et enfin, la conversion du DAG en acide biphosphatidique (Goto *et al.*, 2008).

#### **2.3.5 Structure et classification des protéines kinase C**

Comme mentionnés préalablement, les effecteurs principaux du DAG sont les PKC. Les PKC forment une famille de protéine sérine/thréonine kinases qui est constituée d'au moins 12 isoformes (Budhiraja and Singh, 2008). Ces isoformes sont classifiés en trois catégories basées sur leur structure et leur régulation : les PKC conventionnelles, nouvelles et atypiques (Budhiraja and Singh, 2008). Les isoformes des PKC consistent en une chaîne de polypeptide simple contenant une région régulatrice N-terminale et une région catalytique C-terminale (Budhiraja and Singh,

2008). Ces deux régions sont également composées de régions conservatrices (C1-C4) et de régions variables (V1-V5) (Budhiraja and Singh, 2008). Dans la région régulatrice, le site C1 a deux domaines riches en cystéines qui lient le DAG, la phosphatidylsérine et le phorbol ester (Salamanca and Khalil, 2005). Le site C2 de certains isoformes de PKC est riche en résidus acides, et il lie le calcium (Salamanca and Khalil, 2005). Le site C3 a un site de liaison à l'ATP et il est la cible principale des inhibiteurs des PKC (Budhiraja and Singh, 2008). De son côté, le site C4 reconnaît les substrats des PKC (Budhiraja and Singh, 2008). Le domaine catalytique est bien préservé parmi les isoformes des PKC, on y retrouve les sites C3 et C4 (Budhiraja and Singh, 2008).

Les PKC conventionnelles ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ) possèdent quatre régions conservées (C1-C4) et cinq régions variables (V1-V5) (Salamanca and Khalil, 2005). Elles sont dépendantes du calcium et sont activées par les phospholipides et le DAG (Budhiraja and Singh, 2008). Les PKC nouvelles ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) ne contiennent pas de région C2 (Salamanca and Khalil, 2005). Elles peuvent être stimulées par les phospholipides et le DAG, mais elles sont indépendantes du calcium (Budhiraja and Singh, 2008). Les PKC atypiques ( $\nu$ ,  $\mu$ ,  $1/\lambda$  et  $\zeta$ ) possèdent seulement un motif en doigt de zinc riche en cystéine (Salamanca and Khalil, 2005). Elles sont dépendantes de la phosphatidylsérine, mais elles ne sont pas activées par le DAG, le phorbol ester et le calcium (Salamanca and Khalil, 2005).

### **2.3.5.1 Cibles biologiques des PKC**

Les PKC ont plusieurs cibles biologiques. Elles causent la phosphorylation de la protéine  $G_i$  facilitant la dissociation entre la sous-unité  $\alpha_i$  avec l'adénylate cyclase pour ainsi libérer cette dernière de son inhibition (Kanashiro and Khalil, 1998). Les PKC ont également pour cibles les canaux localisés à la membrane plasmique et les pompes. Par exemple, il a été observé que les PKC inhibent l'activité du canal potassique sensible au calcium (BKc) au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) pulmonaire

(Barman *et al.*, 2004). De plus, les PKC phosphorylent des protéines du cytosquelette et des myofilaments contractiles des CMLV. Les PKC phosphorylent la vinculine (Perez-Moreno *et al.*, 1998), une protéine localisée au niveau des plaques d'adhésions, contrôlant ainsi la forme et l'adhésion cellulaire (Salamanca and Khalil, 2005). Elles phosphorylent également CPI-17 qui, à son tour, inhibent la chaîne légère de myosine (MLC, pour myosin light chain) phosphatase et augmentent la phosphorylation de MLC ce qui augmente la contraction des CMLV (Woodsome *et al.*, 2001).

### **2.3.6 IP<sub>3</sub> et calcium**

Comme mentionné préalablement, l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> par la PLC produit également un autre messenger second, l'IP<sub>3</sub> (Streb *et al.*, 1983). L'IP<sub>3</sub> permet la relâche calcique intracellulaire par une classe spécifique de canaux calciques qu'on appelle les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) qui sont localisés au niveau du réticulum sarcoplasmique ou endoplasmique (Berridge *et al.*, 1989; Taylor and Richardson, 1991). L'IP<sub>3</sub> a une demi-vie de quelques secondes. Suite à sa formation, il reforme rapidement du PIP<sub>2</sub>. Tout d'abord, il est transformé en inositol par trois déphosphorylations successives (cycle de l'inositol phosphate), qui le convertit en inositol 1-4-biphosphate (IP<sub>2</sub>), puis en inositol 4-phosphate (IP<sub>1</sub>) et, finalement, en myo-inositol libre, qui, par la suite, réincorpore un nouvel inositol phospholipide (Voet and Voet, 1998). L'enzyme qui catalyse cette dernière étape, l'IP<sub>1</sub> phosphatase, est inhibée par le lithium (Li<sup>+</sup>) (Allison and Stewart, 1971; Voet and Voet, 1998). L'inositol libre réagit avec un CTP-DAG pour former le phosphatidylinositol (PI), qui, à son tour, est phosphorylé en PIP<sub>2</sub> par deux phosphorylations successives (Voet and Voet, 1998).

Cependant, la relâche du calcium provenant des réserves intracellulaires induite par l'IP<sub>3</sub> est souvent suivie par une phase soutenue d'entrée calcique provenant du milieu extracellulaire (Putney and McKay., 1999). En ce qui concerne les cellules du muscle lisse vasculaire, il y a deux principaux types de canaux calciques qui sont



impliqués dans l'élévation soutenue du calcium intracellulaire induite par les RCPG à la suite de l'activation des PLC: les canaux capacitifs également appelés capacitifs ou «store-operated channels» (SOC) et les canaux récepteurs dépendants (ROC, pour receptor operated channels) (Villereal, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Les SOC sont des canaux ioniques localisés à la membrane plasmique (Hoth and Penner, 1992; Albert *et al.*, 2007). Ils sont activés par la diminution de la concentration calcique à l'intérieur du réticulum endoplasmique et non par une augmentation ou une diminution de la concentration calcique cytosolique (Parekh and Putney, 2005). Dans plusieurs types cellulaires, incluant les CMLV, les SOC génèrent un courant rectifiant entrant nommé le «Ca<sup>2+</sup> release activated Ca<sup>2+</sup> current» (I<sub>CRAC</sub>) (Venkatachalam *et al.*, 2002; Parekh and Putney, 2005; Parekh and Penner, 1997). Deux protéines semblent être importantes pour le bon fonctionnement des SOC; la protéine Orai (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), qui forme le pore du canal des SOC (Albert *et al.*, 2007) et de Stim1 (Roos *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008), une protéine du réticulum endoplasmique (Liou *et al.*, 2005) qui fonctionne comme un senseur de calcium (Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). La diminution de la concentration calcique dans la lumière du réticulum endoplasmique provoque la translocation de Stim1 vers les régions du réticulum endoplasmique qui sont à proximité de la membrane plasmique (Wang *et al.*, 2008; Yeromin *et al.*, 2006). Ce transfert lui permet d'interagir directement avec l'Orai permettant ainsi l'ouverture des SOC et par conséquent à l'entrée du calcium dans le RE (Wang *et al.*, 2008; Yeromin *et al.*, 2006).

Les ROC sont activés généralement suite à une stimulation d'un RCPG couplé aux PLC indépendamment de l'épuisement des réserves calciques internes. La classe canonique de la famille de canaux ioniques potentiels récepteurs transitoires (TRP) connues comme étant des canaux TRPC (11) est divisée en deux sous-groupes : (i) ceux qui sont activés par le DAG, TRPC3, TRPC6 et TRPC7; et (ii) ceux qui ne sont pas

activé par DAG, les TRPC1, TRPC4 et TRPC5 (Wang *et al.*, 2008; Venkatachalam *et al.*, 2002; Freichel *et al.*, 2004; Dietrich *et al.*, 2005a,b; Hofmann *et al.*, 1999; Venkatachalam *et al.*, 2003). TRP6 est fortement exprimé dans les CML (Inoue *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2002) et jouerait un rôle dans la signalisation calcique induite par un récepteur (Inoue *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2002; Albert et Large, 2003; Soboloff *et al.*, 2005). En ce qui concerne les CMLV A7r5, Soboloff et ses collaborateurs ont montré qu'un courant cationique non sélectif sortant était généré par l'activation du récepteur à la vasopressine ou par l'analogue au DAG, le oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) (Soboloff *et al.*, 2005). Dans cette étude l'utilisation du SiRNA contre TRP6 a permis de déterminer que l'augmentation des niveaux du calcium intracellulaire induite par TRP6 est due à l'activation d'un récepteur couplé à la PLC et non par l'épuisement des réserves calciques (Soboloff *et al.*, 2005). Cependant, certaines études suggèrent que les TRPC peuvent être également activés par l'épuisement des réserves calciques (Vazquez *et al.*, 2004). Par exemple, TRPC1 peut former un complexe hétérotétramère avec TRPC5. Il a été observé que ce complexe produisait un courant avec une conductance unitaire qui est similaire à ceux des SOC qu'on retrouve dans les CMLV (Trepakova *et al.*, 2001; Golovina *et al.*, 2001; Alberts and Large, 2002).

L'augmentation du calcium intracellulaire régule un grand nombre de processus cellulaires. Par exemple, au niveau des CMLV et des cardiomyocytes, il permet la contraction de ces cellules (Iino and Tsukioka, 1994; Davis and Tikunova 2008; Voet and Voet, 1998). La contraction des MLV est déclenchée par le calcium parce que la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), enzyme qui phosphoryle les chaînes légères de myosine et stimule la contraction du muscle lisse, n'est activée que lorsqu'elle est associée au complexe Ca<sup>2+</sup>-calmoduline (Hirano, 2007; Voet and Voet, 1998). Lorsque les niveaux calciques intracellulaires diminuent sous l'action de

l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  de la membrane plasmique, la MLCK est désactivée, la MLC est déphosphorylée par la phosphatase de la MLC, ce qui entraîne la relaxation du muscle (Hirano, 2007; Voet and Voet, 1998) (Voet and Voet, 1998). Cependant, au niveau des cellules endothéliales, le calcium module la synthèse et la relâche des facteurs de croissance et des facteurs vasoactifs tels que l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (Ang II) et le monoxyde d'azote (Busse *et al.*, 1991; Inagami *et al.*, 1995). Ainsi, l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  est un messenger second qui transmet les signaux extracellulaires vers l'intérieur d'une cellule.

#### **2.4 Rôles physiologiques et pathologiques de la voie de signalisation de Gαq dans le système cardiovasculaire**

Plusieurs études ont établi l'importance physiologique de la voie de signalisation de Gαq. Des mutations du gène Gαq et Gα11 effectuées chez la souris révèlent l'importance de Gαq et de Gα11 dans la croissance et le développement cardiaque (Offermanns *et al.*, 1998). En effet, des souris ayant une double mutation nulle d'homozygote pour les gènes de Gαq et Gα11 meurent aux stades embryonnaires suite à l'hypoplasie des cardiomyocytes (Offermanns *et al.*, 1998). Par contre, des souris ayant un allèle intact pour l'un des deux gènes meurent rapidement après la naissance suite à une malformation cardiaque (Offermanns *et al.*, 1998).

Dans les situations pathologiques la voie de signalisation de Gαq est associée à l'hypertrophie du myocarde de l'adulte, à l'insuffisance cardiaque (Adams and Brown, 2001) et à l'hypertrophie des CMLV (Ohtsu *et al.*, 2008). Par exemple, des souris transgéniques surexprimant Gαq développent l'hypertrophie cardiaque (D'Angelo *et al.*, 1997). De plus, l'inhibition de la signalisation de Gαq diminue l'hypertrophie des CMLV au niveau des aortes de rats hypertendus (Harris *et al.*, 2007). Il est clairement établi que les stimuli qui induisent l'hypertrophie cardiaque et vasculaire, tels que l'Ang II, l'ET-1 et la norépinéphrine, relaient leurs actions par la voie de signalisation de Gαq

(Harris *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 1991; Ohtsu *et al.*, 2008; Sadoshima and Izumo, 1993; Simpson *et al.*, 1982). L'inhibition de Gαq, par un anticorps spécifique à Gαq, inhibe le grossissement et l'arrangement des myofilaments des cardiomyocytes induite par le phényléphrine (PE) (LaMorte *et al.*, 1994). L'inhibition de Gαq diminue également la prolifération des CMLV induite par l'angiotensine II (Tanski *et al.*, 2004). De plus, Harris et ses collaborateurs (2007) ont révélé que l'inhibition de Gαq diminue la pression sanguine des rats hypertendus d'une manière similaire à l'utilisation d'un antagoniste au récepteur de l'angiotensine et aux thérapies anti-hypertensives courantes. Ces résultats démontrent l'implication de la voie de Gαq dans la pathologie de l'hypertension.

#### **2.4.1 Altération de la voie de signalisation de Gαq dans le diabète et l'hyperglycémie**

Des altérations dans la voie de signalisation induite par Gαq sont observées dans le diabète et les conditions hyperglycémiques (Hasim *et al.*, 2006). Plusieurs études ont montré une augmentation des niveaux des PKC et du DAG ainsi que leur activité dans des tissus provenant de différents modèles diabétiques. Inoguchi et ses collaborateurs (1992) ont observé une élévation d'activité de PKC βII et une augmentation des niveaux du DAG dans l'aorte et le cœur des rats STZ. De plus, l'augmentation des niveaux des PKC et du DAG a été également confirmée dans des rats qui sont spontanément diabétiques, les rats BB (Inoguchi *et al.*, 1992). La normalisation du niveau sanguin de glucose par des transplants de cellules d'îlots de Langerhans de pancréas renverse ces changements biochimiques au niveau du cœur, mais pas au niveau de l'aorte (Inoguchi *et al.*, 1992). De plus, la présence d'une grande concentration de glucose augmente également les niveaux et l'activité des PKC et du DAG au niveau des CMLV de rat et d'humain, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales (Inoguchi *et al.*, 1992; Ramana *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1997). En utilisant des aortes des rats STZ, Abebe et

MacLeod (1991) ont rapporté qu'au cours de la contraction, l'augmentation de la formation d'IP<sub>3</sub> induite par la norépinéphrine était plus grande chez les aortes des rats STZ comparés aux aortes des rats témoins (Abebe and MacLeod, 1991b). Dans une autre étude, ces mêmes auteurs ont décrit que la norépinéphrine induisait une plus grande réponse contractile dans les artères de rats STZ en comparaison avec les artères des rats témoins (Abebe and MacLeod, 1990a). Ces résultats suggèrent que l'élévation des niveaux des PKC et du DAG au niveau vasculaire dans des modèles diabétiques peut contribuer au développement des complications vasculaires chroniques qui sont associées au diabète/hyperglycémie.

De plus, nos laboratoires ont récemment montré que la voie de l'AC/AMPC était également modulée par l'hyperglycémie et le diabète. En effet, nous avons observé que l'hyperglycémie diminue l'expression des protéines G $\alpha$ i et leur fonction dans les CMLV (Hashim *et al.*, 2004). Nous avons également mis en évidence que les aortes de rats STZ et les CMLV provenant d'aortes de rats STZ montrent aussi une diminution de l'expression et de la fonction des protéines G $\alpha$ i (Hashim *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008).

### **3. Le stress oxydatif**

Les espèces réactives oxygénées (ERO) forment une famille de molécules qui comprend l'oxygène et ses dérivées. Les ERO sont formés au cours du processus réduction-oxydation résultant en la formation d'eau à partir d'oxygène (Fridovich, 1997). La réduction de l'oxygène en présence d'un électron libre (e<sup>-</sup>) conduit à la formation d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et du radical hydroxyle (OH<sup>-</sup>) (Touyz and Schiffrin, 2004). Ces molécules possèdent des propriétés oxydantes. L'oxydation se définit comme étant la perte d'électrons d'une molécule, alors que la réduction est définie comme étant un gain d'électron d'une molécule. Des mécanismes de défense par des molécules antioxydantes sont mis en place, afin d'éliminer les ERO lorsqu'elles sont produites (Fridovich, 1997; Griendling and Ushio-

Fukai, 2000). Le stress oxydatif est causé par le déséquilibre entre la production des ERO par rapport à leur élimination (Dröge, 2001; Chan *et al.*, 2006).

Traditionnellement, on considérait que les ERO causaient uniquement des dommages cellulaires au niveau des lipides, des protéines et de l'ADN (Freeman and Crapo, 1982). Maintenant, il y a plusieurs évidences qui démontrent que les ERO n'ont pas que des conséquences toxiques pour le métabolisme cellulaire, mais qu'ils participent également à la régulation et à la signalisation cellulaire (Chiarugi and Cirri, 2003; Griendling *et al.*, 2000a; Reth, 2002; Sauer *et al.*, 2001). Dans les conditions physiologiques, à de faibles concentrations, les ERO régulent la contraction-relaxation des CMLV ainsi que de leur croissance (Cosentino *et al.*, 1994; Rao and Berk, 1992; Touyz and Schiffrin, 1999b; Zafari *et al.*, 1998). Sous des conditions pathologiques, l'augmentation de la production des ERO augmente la contractilité, la croissance et l'apoptose des CMLV, la migration des monocytes, la peroxydation lipidique, l'inflammation, le dépôt des protéines de la matrice extracellulaire et conduit à la dysfonction endothéliale. Tous ces processus contribuent aux dommages vasculaires observés dans les maladies cardiovasculaires (Harrison, 1997; Rao and Berk, 1992).

### **3.1 Métabolisme des espèces réactives oxygénées (ERO)**

Les ERO sont des radicaux libres possédant un électron libre (Szasz *et al.*, 2007). Les joueurs les plus importants sont  $O_2^-$ ,  $OH^-$ , le monoxyde d'azote (NO) et les radicaux lipidiques (Touyz and Schiffrin, 2004). Le  $H_2O_2$ , le peroxydenitrite ( $ONOO^-$ ) et l'acide hypochlorique (HOCl) ne sont pas des radicaux libres, mais ils possèdent tout de même des propriétés oxydantes (Ardanaz and Pagano, 2006). L'anion superoxyde est l'ERO principale, car sa production entraîne la production des autres ERO (Griendling *et al.*, 1994; Touyz *et al.*, 2002). L'anion superoxyde est formé par la réduction univalente d'une molécule d'oxygène (Haber and Willstätter, 1931). C'est une molécule hautement réactive, instable et ayant une courte demi-vie (McCord and Fridovich,

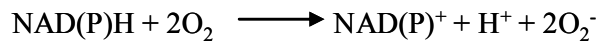
1969). L' $O_2^-$  est soluble dans l'eau, il est imperméable à la membrane, mais il peut traverser la membrane cellulaire par les canaux anioniques (Han *et al.*, 2003; Schafer and Buettner, 2001). L'anion superoxyde agit comme un agent oxydant, lorsqu'il est réduit par une réaction de dismutation en  $H_2O_2$  ou lorsqu'il agit comme agent réducteur donnant son électron en extra au NO pour former le  $ONOO^-$  (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Fridovich, 1997). Contrairement à l'anion superoxyde, le  $H_2O_2$  est une molécule beaucoup plus stable. Il est soluble dans les lipides, traverse la membrane cellulaire et à une plus grande demi-vie que l' $O_2^-$  (Schubert and Wilmer, 1991; Touyz and Schiffrin, 2004). Suite à sa formation le  $H_2O_2$  est converti en  $H_2O$  (Rhee *et al.*, 1999). Le  $H_2O_2$  peut aussi être réduite pour générer une molécule hautement réactive, l' $OH^-$  (Fridovich, 1997). L'hydroxyde radicalaire est extrêmement réactif et, contrairement à l' $O_2^-$  et à le  $H_2O_2$  qui agissent à des distances loin de leur site de formation, il induit des dommages locaux dans le lieu où il est formé (Touyz and Schiffrin, 2004).

### **3.2 Source cellulaire de production des ERO au niveau vasculaire**

Au niveau vasculaire, les ERO sont produites dans les cellules endothéliales, adventiciales et du MLV (Channon and Guzik, 2002; Halliwell, 1999; Rajagopalan *et al.*, 1996; Sorescu *et al.*, 2002; Stralin *et al.*, 1995; Yamawaki *et al.*, 2003). Les ERO sont importantes dans la fonction cellulaire, affectant l'expression des gènes, la prolifération, la migration et la mort cellulaire (Brandes and Kreuzer, 2005). Au niveau vasculaire, plusieurs systèmes enzymatiques contribuent à la formation d'ERO : la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase (NAD(P)H oxydase), la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire mitochondriale et la NO synthase endothéliale (eNOS) (Brandes and Kreuzer, 2005). Bien que toutes ces enzymes contribuent au stress oxydatif, plusieurs évidences démontrent qu'une génération initiale des ERO par la NAD(P)H oxydase déclenche la production des ERO par les autres enzymes (Landmesser *et al.*, 2003).

### 3.3 La NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase est une enzyme constituée de plusieurs sous-unités, elle catalyse la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la réduction d'un électron d'oxygène en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électron dans l'équation suivante (Azumi *et al.*, 1999; Griendling *et al.*, 2000b; Jones *et al.*, 1996; Lassegue and Clempus, 2003):

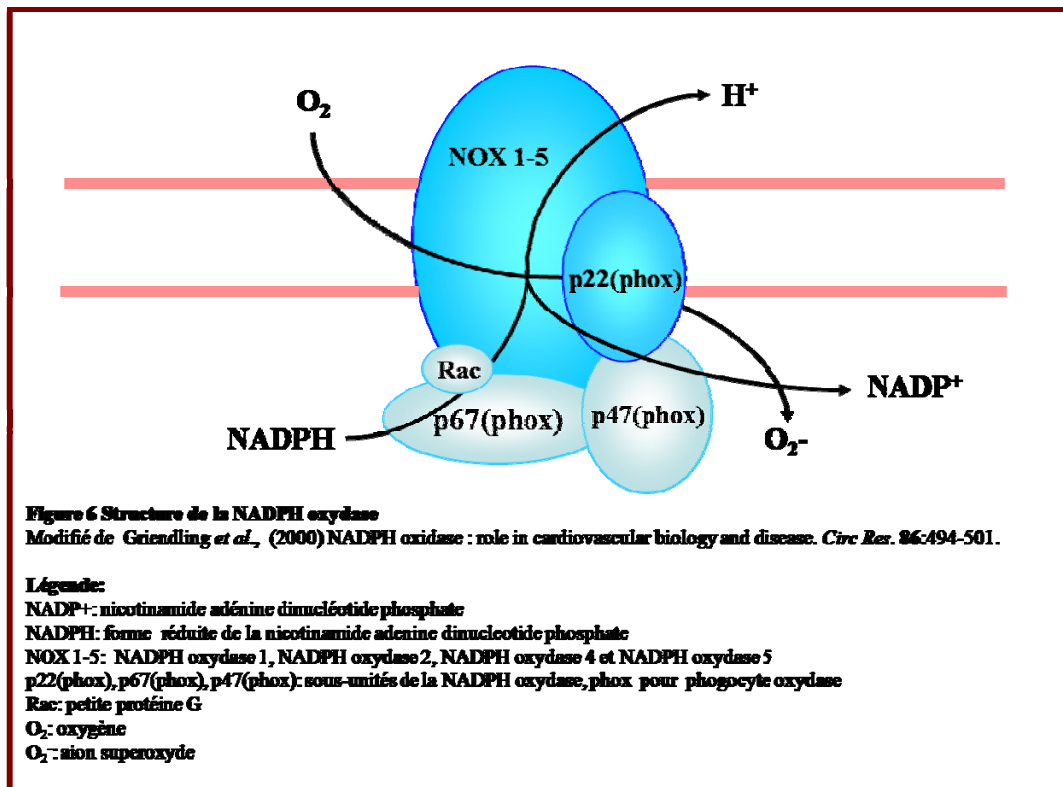


La NAD(P)H oxydase a été tout d'abord décrite et caractérisée dans les phagocytes (les neutrophiles, les granulocytes, les monocytes et les macrophages) (Fridovich, 1974 ; Babior *et al.*, 2002; Leusen *et al.*, 1996; Vignais, 2002). Originellement, on croyait qu'elle était restreinte seulement aux leucocytes et que son rôle se limitait à la défense de l'organisme.

#### 3.3.1 Structure de NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase comprend : deux sous-unités membranaires, p22phox et gp91phox qui est aussi appelée NOX2 (phox pour Phagocyte oxydase), et des sous-unités cytoplasmiques, p47phox, p67phox, p40phox et une petite protéine G Rac (Babior *et al.*, 2002; Vignais, 2002). Le p22phox et le gp91phox, localisés à la membrane, forment un hétérodimère appelé le cytochrome b558 (Touyz and Schiffrin, 2004). Le gp91phox a six domaines transmembranaires contenant deux hèmes et le site de liaison pour la NAD(P)H (Brandes and Kreuzer, 2005). Le cytochrome b558, aussi appelé flavocytochrome b558 à cause de l'association de FAD avec le gp91phox, contient l'appareil de transport d'électron. Donc, le cytochrome b558 est le conduit physique pour le transfert d'électrons à travers la membrane (Cross and Segal, 2004) (figure 6).





### 3.3.2 NAD(P)H oxydase au niveau vasculaire

Il est maintenant clairement établi que la NAD(P)H oxydase joue également un rôle important dans des types cellulaires autres que les phagocytes (Berry *et al.*, 2000; Channon and Guzik, 2002; Lassegue and Clempus, 2003). La NAD(P)H oxydase est l'enzyme impliquée dans la production des ERO la mieux étudiée au niveau cardiovasculaire (Lassegue and Clempus, 2003). Ainsi, elle est la source principale de production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Berry *et al.*, 2000; Channon and Guzik, 2002; Lassegue and Clempus, 2003). Il y a plusieurs caractéristiques qui distinguent la NAD(P)H oxydase vasculaire de celles retrouvées dans les phagocytes. Par exemple, la production basale d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la NAD(P)H oxydase vasculaire est significativement plus faible comparativement à celle produite par l'enzyme des phagocytes (Hohler *et al.*, 2000). L'activité de cette dernière est principalement inductible, alors que l'activité de la NAD(P)H oxydase vasculaire est constitutive et peut augmenter suite à une stimulation par un agoniste tel que l'Ang II (Rueckschloss *et al.*, 2002). De plus, le site de production cellulaire de l'anion

superoxyde, par la NAD(P)H vasculaire, semble être également différent. La NAD(P)H oxydase vasculaire produit l' $O_2^-$  dans le milieu intracellulaire, alors que celle provenant des phagocytes produit l' $O_2^-$  dans le milieu extracellulaire (Lassegue and Clempus, 2003; Li and Shah, 2002). Enfin, le rôle physiologique de la production d'anion superoxyde par les cellules des vaisseaux sanguins se distingue également de celui des phagocytes: au lieu d'une production d'anions superoxydes cytotoxiques comme mécanisme de défense contre les agents pathogènes, l' $O_2^-$ , produit par la NAD(P)H oxydase vasculaire participe à la signalisation cellulaire, ce qui est compatible avec leur faible quantité retrouvée dans les tissus (Szasz *et al.*, 2007).

La NAD(P)H oxydase est présente au niveau de toutes les couches cellulaires des vaisseaux : au niveau de l'intima (Muzaffar *et al.*, 2003), la média (Berry *et al.*, 2000; Touyz *et al.*, 2002a) et l'adventice (Rey and Pagano, 2002). Elle est également présente au niveau des cellules en cultures telles que les CMLV, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Griendling *et al.*, 1994; Seshiah *et al.*, 2002; Touyz *et al.*, 2002a). Toutes les sous-unités de NAD(P)H oxydase phagocytaire sont exprimées à différents degrés au niveau vasculaire. Pour les cellules endothéliales et les cellules de l'adventice, on retrouve les sous-unités p47phox, p67phox, p22phox et gp91phox (Lassegue and Clempus, 2003; Rey and Pagano, 2002; Touyz *et al.*, 2003). La situation est plus complexe au niveau des CMLV puisque les sous-unités majeures ne sont pas toujours détectées. Seulement p47phox et p22phox semblent être exprimés d'une manière constante (Lassegue and Clempus, 2003). Dans les CMLV d'aorte de rat, p22phox et p47phox sont présents, mais pas gp91phox. Par contre, dans les artères de résistances toutes les sous-unités majeures incluant le gp91phox sont exprimées (Azumi *et al.*, 1999; Touyz *et al.*, 2002a; Yamawaki *et al.*, 2003). Récemment, des études ont montré la présence de nouveaux homologues du gp91phox. Ils forment une famille appelée Nox, pour NAD(P)H oxydase (Ago *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2001; Hilenski *et*

*al.*, 2004; Suh *et al.*, 1999). Cette famille comprend sept membres : Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 et Duox2 (Griendling, 2006). Au niveau vasculaire, on retrouve Nox1, Nox4 et Nox5 (Cheng *et al.*, 2001). Nox1 est exprimé en faible quantité dans les CMLV des vaisseaux conducteurs, des cellules endothéliales et des fibroblastes (Griendling, 2004). Nox4 est hautement exprimé dans toutes les cellules du paroi vasculaire, spécialement dans les vaisseaux cérébraux (Miller *et al.*, 2005). Nox5 est retrouvé chez l'humain, mais pas chez les rongeurs (Lyle and Griendling, 2006).

### **3.4 Activation de la NAD(P)H oxydase par les récepteurs couplés aux protéines G**

#### ***Stimulation de la NAD(P)H oxydase par l'Ang II et l'ET-1***

Un grand nombre de ligand aux RCPG active la NAD(P)H oxydase, par exemples : l'Ang II (Seshiah *et al.*, 2002), l'ET-1 (Chen *et al.*, 2006), les catécholamines (Bleeke *et al.*, 2004), l'histamine (Hu *et al.*, 2002), la sérotonine (Lee *et al.*, 1999) et les prostaglandines (Katsuyama *et al.*, 2002).

L'Ang II a été le premier composé identifié ayant la capacité d'augmenter l'activité de la NAD(P)H oxydase dans les CMLV (Griendling *et al.*, 1994). De nombreuses études, ayant pour but de démontrer la fonction *in vivo* de la NAD(P)H oxydase, utilisent l'Ang II comme stimulus pour la génération de l'anion superoxyde vasculaire (Laursen *et al.*, 1997). L'Ang II relaye l'activation de la NAD(P)H oxydase par le récepteur AT<sub>1</sub>, alors que le récepteur AT<sub>2</sub> inhibe l'activité de la NAD(P)H oxydase (Sohn *et al.*, 2000). Un modèle biphasique de la formation d'anion superoxyde a été proposé (Seshiah *et al.*, 2002). Tout d'abord, une activation initiale de la NAD(P)H oxydase est relayée par l'action de la PKC. Il a été observé que la PKC phosphoryle la sous-unité p47phox et amorce l'assemblage de la NAD(P)H oxydase à la membrane au niveau des CMLV (Heitzer *et al.*, 1999). L'action à long terme est relayée par l'activation de c-Src, la transactivation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF) et, subséquemment, l'activation de PI3-K qui conduit à une plus

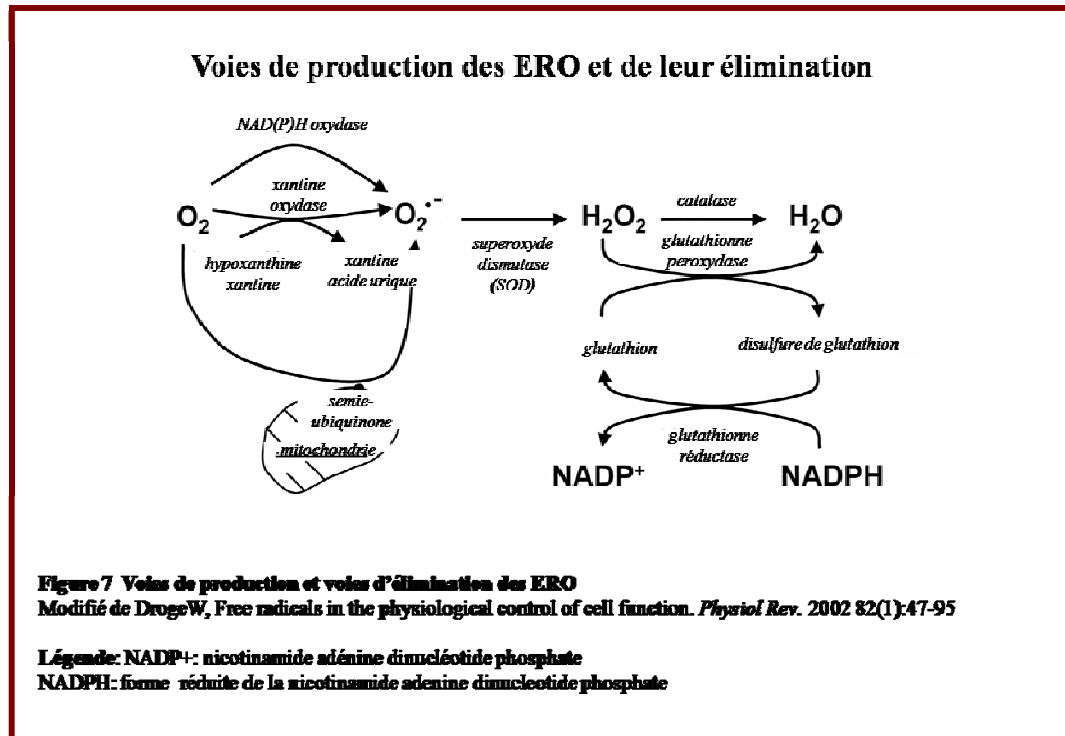
grande activation de la sous-unité rac et à une augmentation soutenue de la formation des ERO (Seshiah *et al.*, 2002). De plus, l'Ang II peut augmenter l'expression des sous-unités de la NAD(P)H oxydase tels que, Nox1, p22phox, gp91phox, p67phox et p47phox au niveau des cellules endothéliales, des CMLV et des fibroblastes (Seshiah *et al.*, 2002; Laufs *et al.*, 2003; Wassmann *et al.*, 2001; Landmesser *et al.*, 2002).

Comme l'Ang II, l'ET-1 est un puissant stimulateur de la production d'anion superoxyde (Wedgwood *et al.*, 2001). De récentes études *in vivo* ont indiqué que l'ET-1 active la NAD(P)H oxydase (Amiri *et al.*, 2004; Duerschmidt *et al.*, 2000; Fei *et al.*, 2000) et que la production des ERO générée peut jouer un rôle important dans l'hypertension induite par les minéralocorticoïdes (Li *et al.*, 2003). De même, Laplante et ses collaborateurs (2005) ont confirmé que l'apocynine, un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, inhibe la production d'anion superoxyde induite par l'ET-1 dans les CMLV. En outre, ils ont montré que cette augmentation d'ERO est attribuée aux récepteurs ET<sub>A</sub> (Laplante *et al.*, 2005). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence un mécanisme pour la production de l'anion superoxyde induite par l'Ang II. Ce mécanisme implique la synthèse et l'action de l'ET-1 pour maintenir la phase soutenue de l'activation de la NAD(P)H oxydase initialement activée par l'Ang II (Laplante *et al.*, 2005). Ils ont indiqué que l'utilisation de l'antagoniste au récepteur ET<sub>A</sub> de l'ET-1, le BQ123, n'avait aucun effet dans la production initiale de l'anion superoxyde. Par contre, celui-ci atténuait l'augmentation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et l'activité de la NAD(P)H oxydase dans la phase tardive induite par l'Ang II (Laplante *et al.*, 2005).

### **3.5 Élimination des espèces réactives oxygénées**

L'élimination des ERO se fait à l'aide de molécules qui, à de faibles concentrations, sont en mesure d'inhiber la formation d'agents oxydants, d'interagir avec lui après qu'une fois qu'il soit formé, et d'empêcher l'oxydation d'autres molécules (Droge, 2002; Duvall, 2005). Les antioxydants qui ont reçu le plus

d'attention sont la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (l'acide ascorbique) et la  $\beta$ -carotène (provitamine A) (Tribble, 1999). Ces vitamines proviennent des fruits et des végétaux (Price and Fowkes, 1997). L'élimination des ERO se fait également à l'aide d'enzymes tels que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathione peroxydase (GPX) et la catalase (Droge, 2002) (figure 7).



### 3.5.1 Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui catalyse la conversion de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en une molécule d'oxygène (Faraci and Didion, 2004). Chez le mammifère, il existe trois familles de SOD qui sont divisées selon leur cofacteur métallique au niveau du site actif : la SOD au cuivre et au zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1) localisée dans le cytosol, la SOD au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) localisée dans la mitochondrie et la SOD au fer (Fe-SOD ou SOD3) localisée au niveau extracellulaire (Faraci and Didion, 2004). Il existe plusieurs rôles physiologiques à ces enzymes. Tout d'abord, les SOD jouent un rôle de protection contre la cytotoxicité

produite par l' $O_2^-$  (Szasz *et al.*, 2007). Un second rôle aux SOD serait de protéger la biocompatibilité du NO, ainsi que de sa signalisation en l'empêchant de réagir avec l' $O_2^-$  pour former le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) (Faraci and Didion, 2004). En combinaison avec des métaux de transitions tels que le fer ( $Fe^{3+}$ ) et le cuivre, le  $H_2O_2$  réagit avec ces métaux de transition pour former  $OH^-$  (Faraci and Didion, 2004).

### **3.5.2 Glutathion Peroxydase**

Le glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme qui contient du sélénium au site actif. Le GPX est responsable de la réduction du  $H_2O_2$  en  $H_2O$ , en oxydant le glutathione en glutathione disulfide (Wassmann *et al.*, 2004 ; Ursini *et al.*, 1995). Le GPX/glutathione est le système de défense majeur lorsque les niveaux de stress oxydatif sont faibles (Wassmann *et al.*, 2004). Chez le mammifère, il existe au moins quatre isoformes de GPX (Wassmann *et al.*, 2004).

### **3.5.3 Catalase**

La catalase est une enzyme homotétramérique contenant un hème (Szasz *et al.*, 2007). On la retrouve principalement dans les péroxisomes et dans le cytosol. Elle catalyse la réaction de peroxyde d'hydrogène en  $H_2O$  et en molécule d'oxygène (Wassmann *et al.*, 2004). La catalase est très efficace quand les niveaux de stress oxydatif sont élevés, car elle protège les cellules contre le  $H_2O_2$  produite à l'intérieur de la cellule (Wassmann *et al.*, 2004).

## **3.6 Rôles physiologiques des espèces réactives oxygénées**

Outre les effets toxiques et les dommages cellulaires, les ERO jouent également un rôle positif dans plusieurs processus biologiques (Ushio-Fukai and Alexander, 2004). À faible concentration, de l'ordre du micromolaire, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène activent la guanylate cyclase soluble et relaient la vasorelaxation des CMLV (Mittal and Murad, 1977). De plus, les ERO régulent l'adhésion cellulaire. Les propriétés adhésives des cellules et des tissus jouent un rôle important dans plusieurs

processus biologiques comme, par exemple, dans l'embryogenèse, la croissance cellulaire et la différenciation cellulaire (Frenette and Wagner, 1996). L'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales est induite par les ERO (Roy *et al.*, 1999; Sellak *et al.*, 1994). Cet effet est aboli par la catalase, mais pas par la superoxyde dismutase. Cela suggère que c'est le peroxyde d'hydrogène qui est l'agent effectif (Sellak *et al.*, 1994). De plus, l'adhérence des neutrophiles, induite par les ERO, est inhibée par un chélateur (scavenger) du radical hydroxyle. Ces résultats suggèrent que l'adhérence des cellules est relayée par le radical hydroxyl formé à partir du peroxyde d'hydrogène de ces cellules. (Droge, 2002).

### **3.7 Les molécules de signalisations ciblées par les espèces réactives oxygénées**

L'observation que les ERO peuvent fonctionner comme un messager second a été fait pour la première fois dans les années 1970. Il avait été observé que l'insuline stimule la production cellulaire d' $H_2O_2$  et que l' $H_2O_2$  exogène mimait les actions de l'insuline (Mukherjee *et al.*, 1978). Par la suite, plusieurs études ont montré l'implication des ERO endogènes dans la cascade de signalisation de plusieurs types cellulaires (Forman *et al.*, 2002; Landmesser *et al.*, 2003). Les cibles majeures des ERO sont les facteurs de transcription, les protéines tyrosines phosphatases (PTP), les protéines tyrosines kinases (PTK), les protéines activatrices de mitogène kinase (MAPK, pour mitogen-activated protein kinase), les canaux ioniques et les phospholipases (Droge, 2002).

#### ***Facteurs de transcriptions***

Les facteurs de transcriptions ont été les premières protéines de signalisation à être identifiées comme ayant une sensibilité rédox. Le facteur nucléaire  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ , pour nuclear factor  $\kappa B$ ) est le prototype des facteurs de transcription ayant une sensibilité rédox (Touyz, 2004). Le NF- $\kappa B$  est séquestré dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe avec son inhibiteur I $\kappa B$  (Touyz, 2004). Les ERO influencent

l'activité de NF- $\kappa$ B à l'aide de modifications oxydatives des résidus de cystéines en dégradant I $\kappa$ B et en augmentant la cascade de signalisation en amont (Droge, 2002). NF- $\kappa$ B régule la transcription de plusieurs gènes qui sont impliqués dans l'inflammation et la croissance vasculaire (Thannickal and Fanburg, 2000). La protéine activatrice 1 (AP-1, pour activator protein-1) est un autre facteur de transcription ayant une sensibilité redox (Touyz, 2004) dont l'activité est régulée par les ERO par la cascade de la kinase JNK. JNK phosphoryle les résidus sérines 63 et 73 du domaine de transactivation NH<sub>2</sub>-terminale de c-Jun (Karin *et al.*, 1997).

### ***Protéines tyrosines phosphatases et protéines kinases***

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un oxydant doux qui a la capacité d'oxyder les résidus de cystéine des protéines. Le pKa des groupes sulfhydryle des résidus cystéines (Cys-SH) est approximativement de 8.5. Le Cys-SH est moins sensible à l'oxydation induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que l'anion thiolate des cystéines (Cys-S<sup>-</sup>). On retrouve alors dans les cellules peu de protéines possédant de résidu de cystéine vulnérable à l'oxydation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim and al., 2000). Cependant, certaines protéines ont des résidus de cystéines qui ont des valeurs de pKa faibles. Ces cystéines existent sous la forme d'anion thiolate à PH neutre parce qu'ils sont près des résidus d'acides aminés chargés positivement qui sont disponibles pour interagir avec l'anion thiolate qui est chargé négativement. Les protéines ayant des résidus de cystéine à pKa faible peuvent être la cible spécifique pour une oxydation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette oxydation peut être renversée par un donneur de thiol tel que la GSH, la glutaredoxin et la thioredoxine (Trx).

Parmi les protéines qui possèdent des résidus de cystéines à faible pKa, on retrouve les protéines tyrosines phosphatase (PTP). Les résidus de cystéines des PTP ont un pKa d'une valeur qui se situe entre 4.7 et 5.4. (Denu and Dixon, 1998a). Les protéines tyrosines phosphatases (PTP) forment une large famille de récepteurs et d'enzymes qui sont des régulateurs de plusieurs voies de signalisation (Andersen *et al.*,



2001). À cause de leur structure particulière, les PTP sont sensibles à l'oxydation et à l'inactivation par les ERO. Toutes les PTP possèdent un domaine de 230 acides aminés conservé qui contient une cystéine réactive et ayant une sensibilité rédox. Cette cystéine catalyse l'hydrolyse des résidus phosphotyrosine des protéines par la formation d'un intermédiaire, le cystéinyl-phosphate (Denu and Tanner, 1998b). Cette cystéine forme le thiol phosphate, un intermédiaire dans la réaction de déphosphorylation des PTP. L'oxydation par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de ce résidu de cystéine en acide sulfénique (Cys-S-OH), rends le PTP complètement inactifs (Denu and Tanner, 1998b).

Les récepteurs tyrosine kinase membranaire et les protéines tyrosine kinases cytoplasmiques sont également la cible des ERO (Droge, 2002; Thannickal and Fanburg, 2000). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène induit la phosphorylation de tyrosine et l'activation du récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-R) et du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGF-R). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relaient ces effets probablement en inhibant la déphosphorylation de PDGF-R et d'EGF-R par l'inactivant des PTP (Touyz, 2004). Dans les conditions pathologiques qui sont associées avec le stress oxydatif, les ERO peuvent directement activer les récepteurs à la surface cellulaire. Les non-récepteurs tyrosine kinase tels que Src, JAK2, STAT, p21Ras, PyK2 et AKT sont impliqués dans le remodelage cardiovasculaire et le dommage vasculaire, et sont régulés par les ERO (Touyz, 2004).

### ***MAP kinases***

Les MAP kinases (MAPK) forment une famille ubiquitaire de protéines sérine/thréonine kinases qui participent dans la signalisation classique associée à la prolifération, la croissance et la mort cellulaire (Torres and Forman, 2003). Chez les mammifères ERK 1/2, MAPK p38 et JNK sont les MAPK les mieux caractérisés. L'augmentation des MAPK dans l'hypertension, l'athérosclérose et le diabète semble être le mécanisme majeur qui contribue au dommage vasculaire associé à ces conditions

(Torres and Forman, 2003; Touyz *et al.*, 2002b). Le mécanisme par lequel les MAPK sont activées par les ERO n'est pas très bien défini. Cependant, les MAPK phosphatases sont des cibles possibles. Semblables aux PTP, les MAPK phosphatases contiennent également une cystéine ayant une sensibilité redox. L'inhibition des MAPK phosphatases par les ERO, par les modifications oxydatives, résulte en une activation des MAPK (Thannickal and Fanburg, 2000). L'autre processus par lequel les ERO influencent l'activité des MAPK peut être par les activateurs qui sont en amont, tels que la tyrosine kinase Src, la petite protéine G Ras et la PKC (Forman *et al.*, 2002; Forman and Torres, 2002).

### ***Transport calcique***

Les ERO modulent également la concentration du calcium intracellulaire, un composant très important dans la contraction vasculaire (Touyz, 2004). L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène augmente le calcium intracellulaire dans les CMLV et les cellules endothéliales (Lounsbury *et al.*, 2000). Ces effets sont attribués à l'augmentation de la mobilisation du calcium induite par l'IP<sub>3</sub> qui dépend des ERO, à une augmentation de l'influx calcique et à une diminution de l'activation du Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Gao and Lee, 2001). Des études récentes ont rapporté que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendre une réponse contractile exagérée au niveau des artères de rats qui sont spontanément hypertendus (SHR) en comparaison aux rats témoins (Gao and Lee, 2001). De plus, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit une augmentation transitoire du calcium intracellulaire dans les CMLV de rats SHR (Tabet *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent qu'en plus d'une mauvaise vasorelaxation dépendante de l'endothélium, le changement calcique qui dépend des ERO peut contribuer à l'altération du tonus vasculaire.

### **3.8 Implication des espèces réactives oxygénées dans le dommage vasculaire**

L'élévation des ERO est toxique pour le bon fonctionnement de la cellule. Les ERO affectent l'homéostasie de la cellule en amenant des dommages oxydatifs sur les

composantes de base de la cellule (Szasz *et al.*, 2007). Les ERO causent une modification des protéines. Cette modification oxydative change la conformation des acides aminés et amène un changement dans la fonction de la protéine ou augmente sa susceptibilité à la protéolyse (Davies, 1987; Droge, 2002). Les ERO entraînent également des modifications oxydatives aux lipides et aux acides nucléiques (Szasz *et al.*, 2007).

Les ERO engendrent des dommages oxydatifs qui affectent le bon fonctionnement vasculaire par exemple : la croissance des CMLV, la migration cellulaire, la déposition de collagène et l'altération de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMP, pour Matrix metalloproteinase), un facteur important dans le remodelage des artères dans les maladies cardiovasculaires (Griendling *et al.*, 2000b; Touyz, 2000; Wilcox, 2002). Dans les cellules endothéliales, le stress oxydatif induit l'apoptose provoquant ainsi un mauvais fonctionnement de ces cellules. De plus, le stress oxydatif stimule l'activation des facteurs de transcriptions (ex. NFκB et AP-1) et des gènes pro-inflammatoires (cytokines et interleukines), l'augmentation des niveaux des molécules d'adhésion (ex. ICAM, VCAM, PECAM), la production des chémokines (ex. MCP-1) et le recrutement des cellules inflammatoires (monocytes, macrophages), processus impliqué dans l'inflammation et lors de plaies vasculaires (Griendling *et al.*, 2000b; Touyz *et al.*, 2002b). L'augmentation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> altère également la relaxation dépendante de l'endothélium, augmente la réactivité contractile, puis altère le tonus vasculaire. Ces effets peuvent être relayés directement par l'élévation du calcium cytosolique ou indirectement en diminuant la biodisponibilité du NO (Lounsbury *et al.*, 2000).

### **3.9 Implication du stress oxydatif dans le diabète et l'hyperglycémie**

Le stress oxydatif est associé aux complications cardiovasculaires observées dans l'hypertension, le diabète et l'hyperglycémie (Baynes and Thorpe, 1999; Cai and

Harrison, 2000). Récemment, nous avons montré que dans les CMLV, la diminution de l'expression et des fonctions des protéines Gai induite par l'hyperglycémie était attribuable à l'augmentation d' $O_2^-$  et de  $ONOO^-$  (Li *et al.*, 2008). Effectivement, la présence d'un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase (le DPI) et des chélateurs du  $ONOO^-$  (le MnTBAP et l'acide urique), a ramené l'expression des protéines Gai et de leur fonction au niveau des cellules témoins. Cependant, le prétraitement avec un chélateur de  $H_2O_2$  (la catalase) n'affecte pas la diminution des niveaux de Gai et de leur fonction induite par l'hyperglycémie (Li *et al.*, 2008). En effet, nous avons observé que la catalase n'avait aucun effet sur la diminution de l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase induite par une forte concentration de glucose (Li *et al.*, (2008). Aussi, dans cette même étude, nous avons observé que les CMLV provenant d'aorte de rats STZ et les CMLV exposées à une haute concentration de glucose montraient une augmentation de la production d' $O_2^-$  (Li *et al.*, 2008). De plus, il a été confirmé que l'hyperglycémie cause l'augmentation de la production des ERO par les mitochondries dans les cellules endothéliales provenant d'aorte bovine (Nishikawa *et al.*, 2000). La diminution de la production des ERO, à l'aide d'un inhibiteur du complexe II de la chaîne de transport des mitochondries, prévenait les complications secondaires associées au diabète/hyperglycémie, c'est-à-dire l'augmentation de l'activation des PKC et de la formation des produits de glycation avancée (AGE) (Nishikawa *et al.*, 2000). Également, Liu et al. (2007) ont récemment montré que l'augmentation d' $O_2^-$ , induite par l'hyperglycémie, était abolie par l'apocynine, un inhibiteur spécifique de la NAD(P)H oxydase, au niveau des CMLV (Liu *et al.*, 2007). Cependant, le traitement avec la roténone, un inhibiteur du complexe I de la chaîne de transport des mitochondries, ou l'oxypurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, n'affectait pas l'augmentation de la formation de l' $O_2^-$  induite par l'hyperglycémie (Liu *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que la NAD(P)H oxydase est responsable de l'augmentation de

la production d' $O_2^-$  induite par une forte concentration de glucose au niveau des CMLV. Kunisaki et ces collaborateurs (1994) ont rapporté que l'injection intrapéritonéale d' $\alpha$ -tocophérol (un antioxydant) à des rats STZ prévenait l'augmentation du DAG et des PKC au niveau de l'aorte. Dans cette même étude, ils ont également indiqué que l'addition d' $\alpha$ -tocophérol, au niveau des CMLV, prévenait l'augmentation du DAG ainsi que des PKC induite par l'hyperglycémie (Kunisaki *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que l'augmentation du DAG et des PKC, observée dans le diabète et dans des conditions d'hyperglycémie, peut être causée par le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie.

### ***Production des espèces réactives oxygénées par l'hyperglycémie***

Le glucose engendre l'augmentation de la production du stress oxydatif et altère le système antioxydant par plusieurs mécanismes (Inoguchi *et al.*, 2000). Tout d'abord, le glucose peut causer une glycation non enzymatique des protéines formant ainsi des produits de glycation avancée qui peuvent générer les ERO (Baynes and Thorpe, 1999). Le glucose libre augmente l'activité de l'aldose réductase, enzyme clef de la voie des polyols, qui amène une réduction du ratio NAD(P)H/NAD<sup>+</sup> (Dunlop, 2000). De plus, l'excès de glucose peut activer les PKC par différents mécanismes tels qu'une synthèse de novo du DAG par l'activation des PLC et par l'inhibition de la DAG kinase (King *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1994). Les PKC activées peuvent alors activer la NAD(P)H oxydase (Inoguchi *et al.*, 2000). Ces mécanismes mis ensemble augmentent les niveaux du stress oxydatif dans les conditions de diabète et d'hyperglycémie.

## **4. Les peptides vasoactifs**

### **4.1 Endothéline-1**

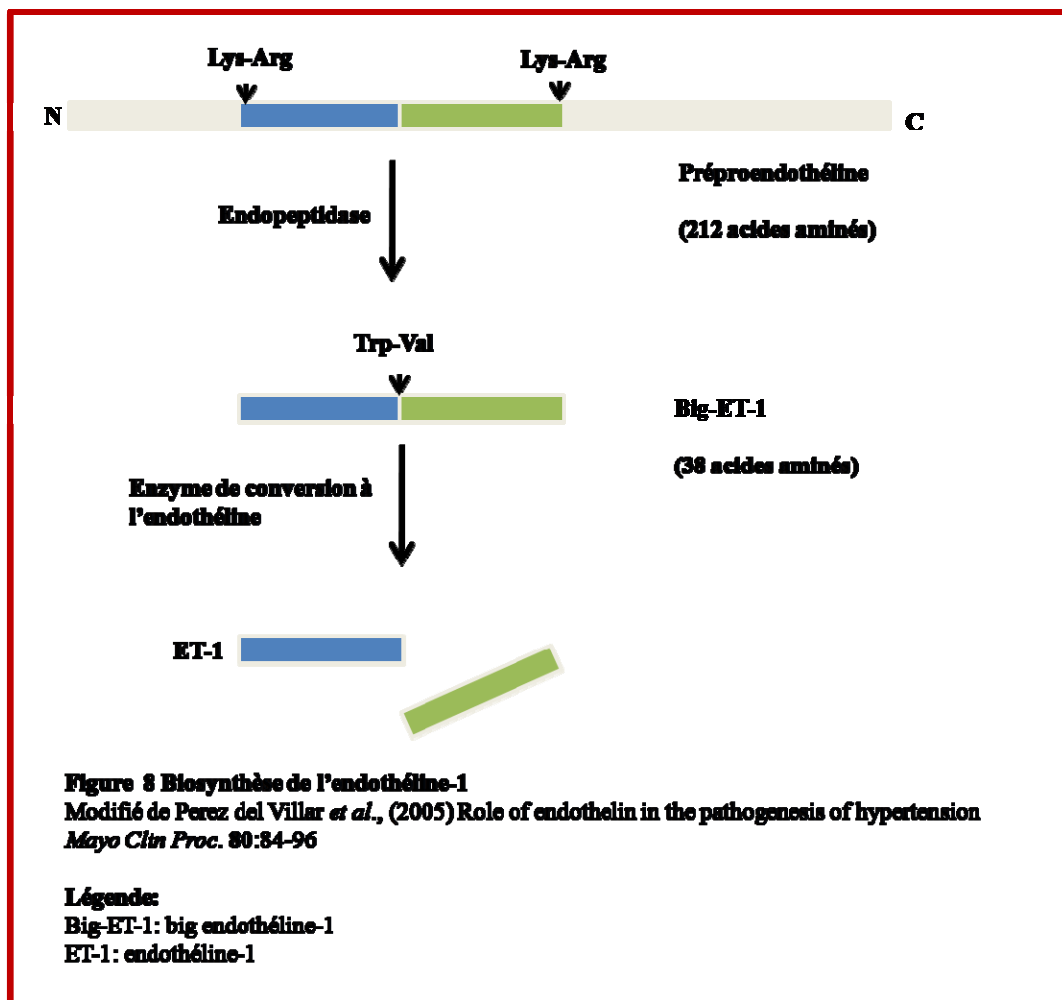
Dans le milieu des années 1980s, Hickey et ses collaborateurs ont détecté un facteur produit par les cellules endothéliales qui induisait la vasoconstriction des CMLV (Hickey *et al.*, 1985). En 1988, cette substance a été isolée par Yanagisawa à partir des

cellules endothéliales provenant d'aortes porcines et fut appelée ET (Yanagisawa *et al.*, 1988). La famille d'ET est constituée de trois isoformes, dont l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3, comprenant tous 21 acides aminés, et d'un isoforme ayant 31 acides aminés, l'ET-4 (Heynynen and Khalil, 2006). L'ET-1 est l'isoforme prédominant relâché par l'endothélium vasculaire (Lüscher and Barton, 2000).

#### **4.1.1 Production de l'endothéline-1**

Plusieurs facteurs stimulent la production de l'ET-1 tels que les hormones vasoactives, les facteurs de croissance, l'hypoxie et le stress oxydatif (Gray G, 1995). Alors que le NO, les peptides natriétiques et les prostaglandines inhibent sa production (Gray G, 1995), l'ET-1 est produite principalement par les cellules endothéliales (Nakano *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1989). Elle est également produite par les CMLV (Goraca, 2002), les cellules épithéliales pulmonaires, les macrophages, les fibroblastes, les cardiomyocytes et les neurones (Kedzierski and Yanagisawa, 2001; Lee *et al.*, 1990; Rubanyi and Botelho, 1991; Sakai *et al.*, 1996).

L'ET-1 est synthétisée à partir de son précurseur, la préproendothéline-1 (Yanagisawa *et al.*, 1988). La préproendothéline-1 est une protéine de 212 acides aminés qui subit un clivage protéolytique aux positions Lys<sup>51</sup>-Arg<sup>52</sup> et Arg<sup>92</sup>-Arg<sup>93</sup> par une endopeptidase spécifique aux paires d'acides aminés dibasiques pour produire le peptide, l'intermédiaire de 38 acides aminés, le big-ET-1. Le big-ET-1 est par la suite clivé à la position Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> par une autre endopeptidase, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour former l'ET-1 (Goto *et al.*, 1996) (figure 8).



#### 4.1.2 Les récepteurs de l'ET-1

L'ET-1 relaie ses effets biologiques par deux types de récepteurs :  $ET_A$  et  $ET_B$ . Ceux-ci sont des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Hosoda *et al.*, 1992). Le récepteur  $ET_A$  a une affinité plus grande pour l'ET-1 que pour l'ET-3, alors que le récepteur  $ET_B$  a une affinité égale pour les trois isoformes d'ET (Sticherling, 2006). Les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  sont exprimés dans plusieurs organes tels que le cœur, le rein et les poumons (Goraca, 2002). Au niveau vasculaire, les récepteurs  $ET_A$  sont présents à la surface des CMLV des vaisseaux sanguins et des artères (Hosoda *et al.*, 1991). Lorsqu'ils sont stimulés par un agoniste, les récepteurs  $ET_A$  induisent la vasoconstriction et la prolifération cellulaire (Rich and McLaughlin, 2003). Par contre, les récepteurs  $ET_B$  sont prédominants au niveau des

cellules endothéliales, mais ils sont également présents sur les CMLV (Rich and McLaughlin, 2003). Au niveau des cellules endothéliales, la stimulation des récepteurs ET<sub>B</sub> induit la relâche du NO et de la prostacycline (Warner *et al.*, 1989; Hirata *et al.*, 1993) et permet la survie des cellules endothéliales (Shichiri *et al.*, 1997; Naomi *et al.*, 1998). De plus, les récepteurs ET<sub>B</sub> sont également importants pour l'élimination de l'ET-1 circulante (Rich and McLaughlin, 2003). Un troisième récepteur a été découvert chez le *Xenopus laevis*, le récepteur ET<sub>C</sub>. Cependant, on ne le retrouve pas chez les mammifères (Karne *et al.*, 1993).

#### **4.1.3 Le récepteur ET<sub>A</sub>**

Le récepteur ET<sub>A</sub> est un récepteur d'une longueur de 427 acides aminés (Hunley and Kon, 2001). L'utilisation d'antagonistes aux récepteurs de l'ET a permis d'identifier le rôle des récepteurs de l'ET-1 dans plusieurs systèmes (Nagata *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2002). Le BQ123, le BQ610 et l'ABT627 sont des antagonistes sélectifs du récepteur ET<sub>A</sub> (Nagata *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2002). Basés sur leur sensibilité au BQ123, les récepteurs ET<sub>A</sub> peuvent être sous-classés en ET<sub>A1</sub> et ET<sub>A2</sub>. L'ET<sub>A1</sub> est sensible au BQ123, alors que l'ET<sub>A2</sub> y est résistant (Endoh *et al.*, 1998). Le BQ123 inhibe la contraction de l'aorte abdominale induite par l'ET-1 (Zhou *et al.*, 2004). De plus, la contraction induite par l'ET-1 dans les artères de résistances humaines et de rats est inhibée par le BQ123 et le BQ610 (Schiffrin, 1995). Ces résultats suggèrent que la fonction principale du récepteur ET<sub>A</sub> consiste à maintenir le tonus vasculaire en modulant la vasoconstriction (Frommer and Muller-Ladner, 2008). Donc, l'activation du récepteur ET<sub>A</sub> augmente la pression sanguine (Frommer and Muller-Ladner, 2008).

#### **4.1.4 Le récepteur ET<sub>B</sub>**

Le récepteur ET<sub>B</sub> est un récepteur d'une longueur de 442 acides aminés (Arai *et al.*, 1993). Des études pharmacologiques ont permis d'identifier deux sous-types soit



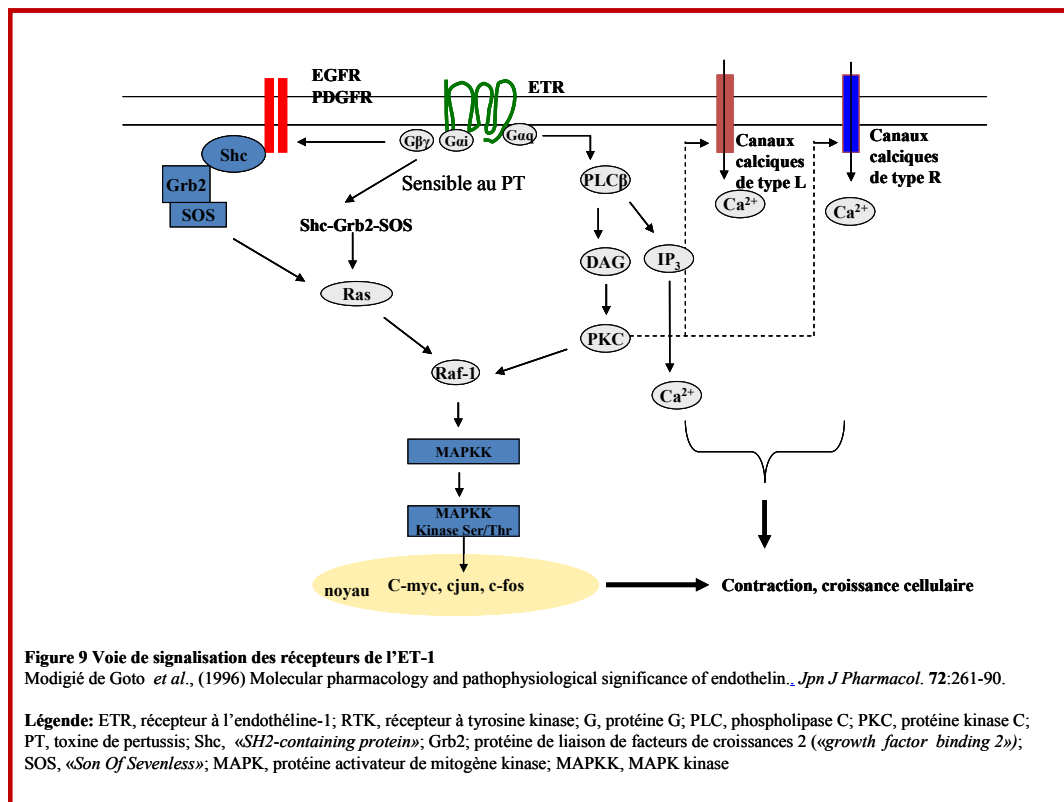
ET<sub>B1</sub> et ET<sub>B2</sub> (Sakurai *et al.*, 1990; Bigaud and Pelton, 1992) Au niveau vasculaire, ET<sub>B1</sub> est localisé dans les cellules endothéliales alors que le sous-type ET<sub>B2</sub> est au niveau des CMLV. Au niveau des cellules endothéliales, la stimulation du récepteur ET<sub>B</sub> augmente l'activité de la eNOS et la relâche du NO (Hirata *et al.*, 1993; Pollock, 1999). Le récepteur ET<sub>B</sub> au niveau endothélial relaie également la relâche de la prostacycline (Gurbanov *et al.*, 1996). Ces deux agents, le NO et la prostacycline, permettent la vasorelaxation des CMLV. Pour illustrer le rôle du récepteur ET<sub>B</sub> dans la régulation de la pression sanguine, des études ont confirmé que les souris «*knockout*» du gène ET<sub>B</sub> (+/-) étaient hypertendues (Berthiaume *et al.*, 2000). Bien qu'il est très clairement établi que le récepteur ET<sub>A</sub> relaie la vasoconstriction, en utilisant des agonistes et antagonistes sélectifs pour les récepteurs de l'ET-1, des études ont suggéré que la vasoconstriction dans des artères sous-cutanées humaines et mésentérique de rats serait relayé par le récepteur ET<sub>B</sub> (Schiffrin, 2001). De plus, l'administration d'un agoniste sélectif pour le récepteur ET<sub>B</sub> *in vivo* ou au niveau des vaisseaux sanguins isolés cause la vasoconstriction (Schiffrin, 2001). On retrouve abondamment le récepteur ET<sub>B</sub> au niveau de l'épithélium tubulaire de la médulla rénale (Karet *et al.*, 1993). L'ET-1, par le récepteur ET<sub>B</sub>, peut inhiber le sodium et la réabsorption d'eau (Pollock and Pollock, 2001).

#### **4.1.5 Mécanisme de signalisation des récepteurs de l'ET-1**

Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, sont couplés à divers types de protéines G : Gq/11 $\alpha$ , Gs $\alpha$ , et Gi $\alpha$  (Cai and Harrison, 2000; Goto *et al.*, 1996; Takigawa *et al.*, 1995). Cela suggère que la transduction de la signalisation intracellulaire induite par l'ET-1 diffère dépendamment du type de protéine G qui est couplé à son récepteur. La voie PLC/IP<sub>3</sub> est la voie la plus activée par l'ET-1, et ce, dans divers tissus (Badr *et al.*, 1989; Takuwa *et al.*, 1990). Dans les CMLV, l'ET-1 se lie à ses récepteurs, active les protéines Gq/11 $\alpha$  qui stimulent la PLC, amenant l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et DAG (Resink *et al.*, 1988;

Griendling *et al.*, 1989). L'IP<sub>3</sub> stimule la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique et permet une entrée du calcium extracellulaire par les canaux calciques voltage dépendants de types L situés à la membrane plasmique (Hirata *et al.*, 1988; Pollock *et al.*, 1995). Le DAG formé active la PKC qui active les canaux calciques de type L (He *et al.*, 2000) et de type R (Cai and Harrison, 2000). Cette augmentation du calcium intracellulaire induit la vasoconstriction ou stimule la sécrétion dépendamment du type cellulaire (figure 9). Par exemple, dans les CMLV, l'augmentation du calcium intracellulaire induit une vasoconstriction, alors que dans les cellules endothéliales, elle permet la relâche du facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) (Kanaide, 1996; Aoki *et al.*, 1991).

En plus d'être un puissant vasoconstricteur, l'ET-1 possède des propriétés mitogéniques dans des cellules telles que les CMLV (Chua *et al.*, 1992) (figure 9), des myocytes cardiaques (Bogoyevitch *et al.*, 1993) et autres. L'activation de PKC, induite par l'ET-1, active la voie MAP Kinase constituée de raf-1 qui induit la MAPKK qui active la MAPK (Cazaubon *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1992), ce qui permet l'activation des proto-oncogènes tels que *c-fos*, *c-mic* et *c-jun* (Simonson, 1993). Par contre, Kasuya et ses collaborateurs (1994) ont mis en évidence que l'activation des MAPK activées par l'ET-1, est également sensible à la toxine de pertussis (Kasuya *et al.*, 1994). De plus, cette augmentation des MAPK, était accompagnée par la formation d'un complexe shc-Grb2-SOS (Cazaubon *et al.*, 1994; Takigawa *et al.*, 1995). D'autre part, des études menées par Daub et ses collaborateurs en 1996 ont décrit que l'ET-1 active la voie raf/MAPK et la synthèse d'ADN en stimulant les récepteurs à l'EGF. Ces résultats démontrent le rôle des récepteurs tyrosines kinases comme étant des effecteurs qui relaient la signalisation mitogénique des RCPG (Daub *et al.*, 1996).



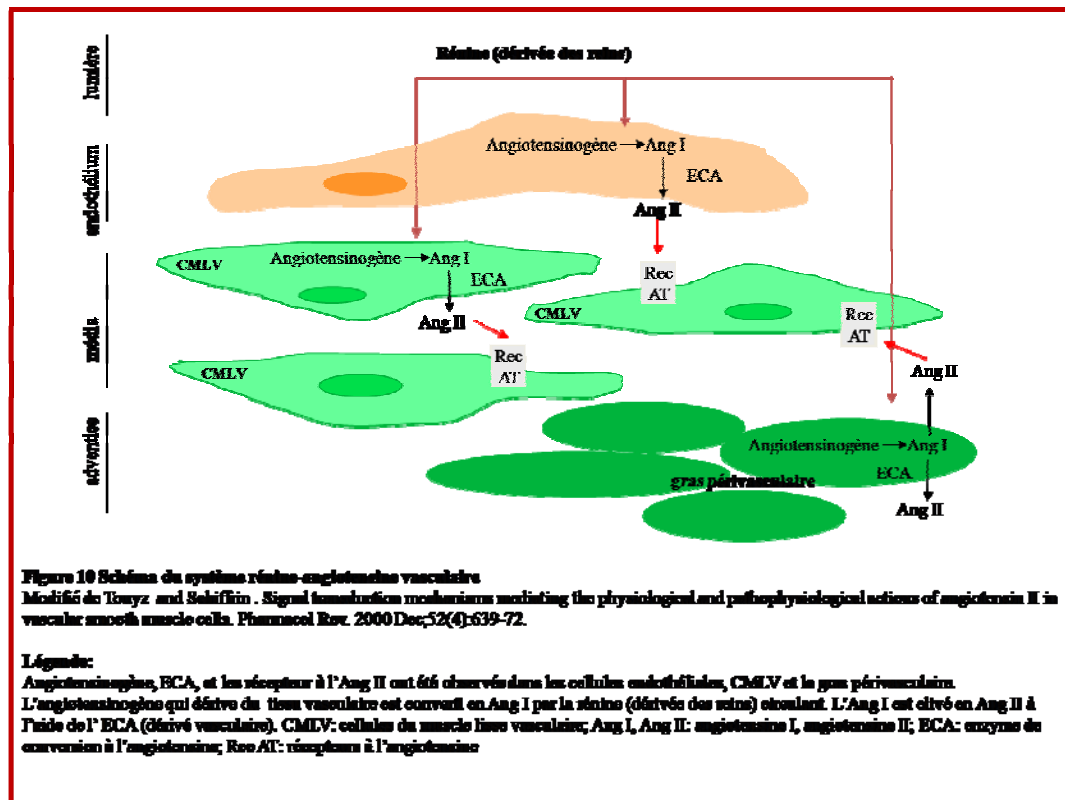
## 4.2 Angiotensine II

L'Ang II, une hormone octapeptide isolée en 1940 par Braun-Mendez et ses collaborateurs (1940) est la composante active du système rénine-angiotensine (SRA) (Braun-Menendez *et al.*, 1940). L'Ang II est un peptide multifonctionnel qui exerce de nombreuses actions. Il régule la pression sanguine et la balance d'électrolyte par ses actions sur le tonus vasculaire, la sécrétion d'aldostérone, la vasopressine, la filtration glomérulaire au niveau du rein, la soif (Hunyady and Catt, 2006). Au niveau des CMLV, l'Ang II module le tonus vasculaire, la croissance cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire, la déposition de la matrice extracellulaire, et stimule la production des facteurs de croissance (ex. PDGF et IGF-1) et des peptides vasoactifs (ex. ET-1) (Touyz and Schiffrin, 2000). Par conséquent, l'Ang II joue un rôle important en contrôlant la fonction et l'intégrité structurale de la paroi artérielle et également dans les mécanismes pathologiques qu'on retrouve dans les maladies vasculaires (Touyz and Schiffrin, 2000). Par exemple, l'Ang II est impliqué dans la prolifération et

l'hypertrophie des CMLV (Hashim *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006) caractéristiques du remodelage vasculaire observé dans l'hypertension (Intengan and Schiffrin, 2000).

#### 4.2.1 Production d'angiotensine II

L'Ang II est produite, soit par la voie classique, c'est-à-dire par le SRA au niveau rénal ou soit localement par le SRA au niveau des tissus (Touyz and Schiffrin, 2000). Par la voie classique, la rénine (un produit rénal circulant) coupe dans la partie N-terminale de l'angiotensinogène (un produit hépatique) pour former l'Ang I, un décapeptide. Ce dernier est alors converti par l'enzyme de conversion (ECA) au niveau des poumons pour former l'Ang II, un important vasopresseur (Skeggs *et al.*, 1967; Dorer *et al.*, 1972; Inagami, 1998; Phillips *et al.*, 1993). Originellement, le SRA était considéré uniquement comme étant un système circulant. Cependant, plusieurs de ses composantes sont localisées au niveau des tissus, suggérant l'existence d'un système rénine-angiotensine locale (Danser, 1996; Dzau, 1989) (figure 10). L'ECA est présent au niveau plasmatique, interstitiel, et intracellulaire. L'ECA tissulaire est présent dans la plupart des organes : le cœur, le cerveau, les vaisseaux sanguins, le rein et les organes reproducteurs (Hollenberg *et al.*, 1998). Toutes les composantes du SRA, sauf la rénine, sont produites au niveau vasculaire. On retrouve l'ECA dans l'adventice, les CMLV et les cellules endothéliales mises en culture (Dzau, 1989; Ekker *et al.*, 1989; Naftilan, 1994). L'expression protéique et d'ARNm de l'angiotensinogène a été détectée dans les CMLV ainsi que dans l'endothélium (Morgan *et al.*, 1996; Naftilan *et al.*, 1991; Naftilan, 1994). Puisque la rénine est absente au niveau vasculaire, la production locale de l'Ang II dans l'interstitium, régulée par l'ECA au niveau tissulaire, dépend probablement de la rénine circulante (Touyz and Schiffrin, 2000).



#### 4.2.2 Les récepteurs de l'Ang II

Dans les cellules de mammifère, l'Ang II relaie ses effets par au moins deux récepteurs membranaires, AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Le récepteur AT<sub>1</sub> est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G (de Gasparo *et al.*, 1995) ayant un poids moléculaire de 43 kDa (Banday *et al.*, 2005). Il a été rapporté que le récepteur AT<sub>1</sub> interagit avec une variété de protéines G, Gαq/11 (Sadoshima and Izumo, 1996; Ushio-Fukai *et al.*, 1998), G<sub>1α</sub> (Graber *et al.*, 1992), Gα12 (Sadoshima, 1998; Ushio-Fukai *et al.*, 1998) et Gα13 (Macrez-Lepretre *et al.*, 1997). Chez l'homme, il n'existe qu'un sous-type de récepteur AT<sub>1</sub>, mais, chez les rongeurs, on en retrouve deux sous-types, AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub>. Des études faites chez les souris «*knockout*» du gène AT<sub>1A</sub> ou AT<sub>1B</sub> suggèrent que les deux sous-types du récepteur AT<sub>1</sub> contribuent à la régulation cardiovasculaire et rénale (Oliverio *et al.*, 1998). Cependant, le sous-type AT<sub>1A</sub> serait le plus important (Zhu *et al.*, 1998). Le récepteur AT<sub>1</sub> relaie la majorité des actions physiologiques de l'Ang II (Sadoshima, 1998). Son rôle est prédominant dans le

contrôle de la fonction vasculaire induite par l'Ang II (Sadoshima, 1998). Au niveau vasculaire, le récepteur AT<sub>1</sub> est présent en grande quantité dans les CMLV, en quantité plus faible dans l'adventice et indétectable dans l'endothélium (Allen *et al.*, 2000; Zhuo *et al.*, 1998).

Le second isoforme du récepteur de l'Ang II est l'AT<sub>2</sub>. Le récepteur AT<sub>2</sub> est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G comprenant 363 acides aminés et ayant un poids moléculaire de 41 kDa (Mukoyama *et al.*, 1993). Le récepteur AT<sub>2</sub> est hautement exprimé dans les tissus fœtaux, puis son expression diminue après la naissance (Nahmias and Strosberg, 1995), suggérant ainsi qu'il y jouerait un rôle important dans le développement fœtal (Shanmugam *et al.*, 1996). Chez l'adulte, l'expression du récepteur AT<sub>2</sub> est détectable au niveau du pancréas, du cœur, du rein, de la glande surrénale, du cerveau et au niveau vasculaire (Touyz and Schiffrin, 1999a; Viswanathan and Saavedra, 1994). Au niveau vasculaire, on le retrouve dans l'adventice et la média (Zhuo *et al.*, 1998). La fonction et le mécanisme de signalisation de ce récepteur ne sont pas très bien définis. Cependant, sous les conditions physiologiques, le récepteur AT<sub>2</sub> semble inhiber les effets relayés par le récepteur AT<sub>1</sub> (Ciuffo *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1998). Le rôle exact du récepteur AT<sub>2</sub> au niveau cardiovasculaire est encore à définir.

#### **4.2.3 Mécanisme de signalisation des récepteurs AT<sub>1</sub>**

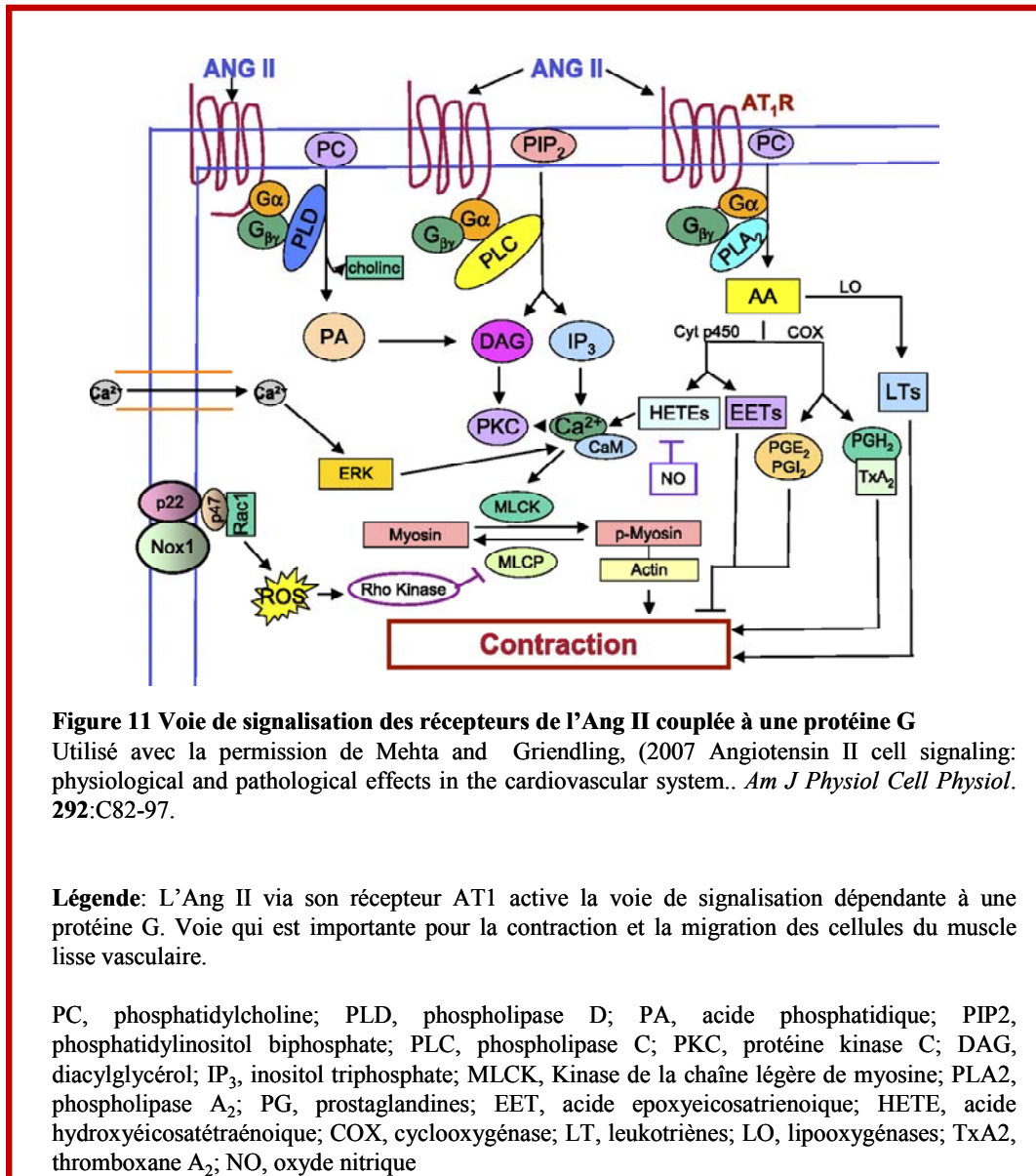
Une fois que l'Ang II se lie au récepteur AT<sub>1</sub>, il active une série de cascade de signalisation qui régule plusieurs effets physiologiques de l'Ang II (Metha and Griendling, 2007). Les voies activées par l'Ang II se divisent en deux : la voie de signalisation couplée à une protéine G et la voie de signalisation non-couplée à une protéine G (Metha and Griendling, 2007).

### ***Voie de signalisation couplée à une protéine G***

L'une des fonctions majeures de l'Ang II est la vasoconstriction. Cette dernière est relayée par la voie de signalisation dépendante d'une protéine G. Une fois activé par l'Ang II, le récepteur AT<sub>1</sub>, couplé à une protéine Gα<sub>q</sub>, Gα<sub>11</sub>, Gα<sub>12</sub> et Gα<sub>13</sub>, active les effecteurs suivants, les PLC, la PLA<sub>2</sub> et la PLD (Ushio-Fukai *et al.*, 1999). L'activation des PLC produit l'IP<sub>3</sub> et le DAG. Puis, l'IP<sub>3</sub> se lie à son récepteur localisé au niveau du réticulum sarcoplasmique pour permettre la relâche du calcium intracellulaire. Le calcium se lie à la calmoduline et active la chaîne légère de la myosine kinase (MLCK) qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine afin d'augmenter les interactions entre la myosine et l'actine, provoquant ainsi la contraction des CMLV (Yan *et al.*, 2003). De plus, le DAG active la PKC qui phosphoryle la pompe Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> afin d'augmenter le pH au cours de la contraction (Vallega *et al.*, 1988). L'activation du récepteur AT<sub>1</sub> amène également l'activation de la PLD qui hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en choline et en acide phosphatidique (AP). L'AP est rapidement convertie en DAG, amenant une activation plus soutenue de la PKC et une contraction plus soutenue. L'Ang II active la PLA<sub>2</sub> ce qui conduit à une production d'acide arachidonic (AA) et de ses métabolites (Griendling *et al.*, 2000b) (figure 11).

Le récepteur AT<sub>1</sub>, aussi couplé aux protéines Gα<sub>i</sub> (Shirai *et al.*, 1995), inhibe l'AC suite à une stimulation par l'Ang II. Anand-Srivastava (1989) a montré que l'Ang II inhibe l'activité de l'AC au niveau du sarcolème de cœur de rats et de lapins et que cette inhibition était abolie par un traitement au PT (Anand-Srivastava, 1989). Dans les cellules adrénocorticales, l'activation de Gα<sub>i</sub> par l'Ang II régule les canaux calciques voltage dépendant de type L et T. Lu et ses collaborateurs (1996), ont indiqué que le prétraitement des cellules glomérulaires avec PT atténue l'augmentation du courant calcique de type T induite par l'Ang II (Lu *et al.*, 1996). Par contre, Maturana et ses collaborateurs ont mis en évidence l'implication de Gα<sub>i</sub> dans l'inhibition de l'activité

des canaux calciques de type-L induite par l'Ang II au niveau des cellules adrénalées glomérulaires (Maturana *et al.*, 1999)



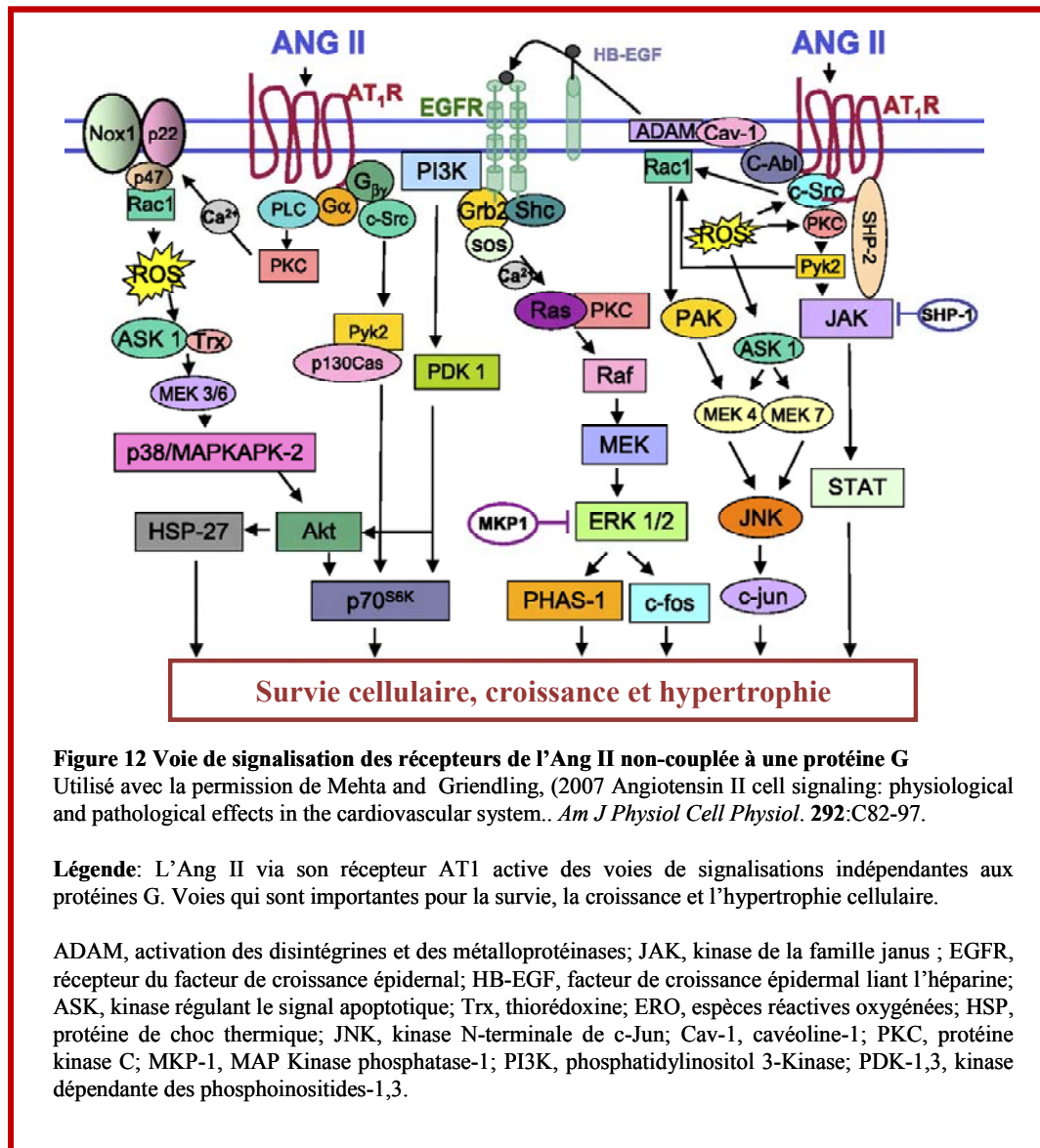


### ***Voie de signalisation non-couplée à une protéine G***

L'Ang II stimule la croissance cellulaire par la phosphorylation des tyrosines kinases, l'activation des MAP kinases, la mobilisation calcique et la production des ERO. L'Ang II, via son récepteur AT<sub>1</sub>, induit la phosphorylation de plusieurs tyrosines kinases tels que : c-Src, les kinases de la famille janus (JAK, janus family kinases), les kinases d'adhésion focale (FAK), pyk2, p130Cas et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Touyz *et al.*, 1999; Eguchi and Inagami, 2000). Touyz et ses collaborateurs (2001) ont montré l'implication de c-Src dans l'action trophique et contractile induite par l'Ang II au niveau des CMLV humaines et de rats (Touyz *et al.*, 2001b; Touyz *et al.*, 2003). De plus, ils ont observé que l'activation de c-Src induite par l'Ang II était associée à la croissance cellulaire chez les personnes atteintes d'hypertension, et dans des modèles d'hypertension expérimentaux (Touyz *et al.*, 2001a; Touyz *et al.*, 2002c). c-Src est un régulateur important pour plusieurs cibles qui sont en aval tels que la MAP kinase, la PLC- $\gamma$ , la Pyk2, les FAK, les JAK, la PI3K et la NAD(P)H oxydase (Touyz, 2005). Ces protéines sont importantes dans la croissance et la survie cellulaire, la réorganisation du cytosquelette et le trafic membranaire (Touyz, 2005) (figure 12).

Dans les CMLV, l'Ang II active les MAP kinases tels que ERK 1/2, MAP kinase p38, JNK et ERK 5 (Touyz and Schiffrin, 2000). ERK 1/2 est phosphorylé par MEK 1/2, alors que JNK et p38MAP kinase sont phosphorylées par MEK 4/7 et MEK 3/6 qui, respectivement, influencent la survie cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'inflammation (Touyz, 2005). L'Ang II active aussi les récepteurs à tyrosine kinase, malgré le fait qu'il ne se lie pas directement à ces récepteurs. Ce processus de transactivation a été confirmé pour les récepteurs à l'EGF, au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF pour platelet-derived growth factor) et au facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF, insulin-like growth factor) (Saito and Berk, 2001). L'Ang II peut induire la transactivation des récepteurs des facteurs de croissance

par l'activation de Pyk2, et de c-Src et par le stress oxydatif (Saito and Berk, 2001) (figure 12).



#### 4.3 L'ET-1 et l'Ang II dans le diabète et l'hyperglycémie

Il est bien connu que l'Ang II ainsi que l'ET-1 jouent un rôle important dans les complications vasculaires observées dans l'hypertension telles que le remodelage vasculaire, l'hypertrophie et la prolifération de CMLV (Kyaw *et al.*, 2001; Marrero *et al.*, 1997). Au niveau du diabète, des études ont rapporté que les niveaux plasmatiques de l'ET-1 et de l'Ang II étaient élevés chez les patients souffrants du diabète de type 1 et de type 2 ainsi que chez les modèles d'animaux diabétiques expérimentaux (Collier *et*

*al.*, 1992; Hargrove *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 1993). Plusieurs études ont observé qu'une grande concentration de glucose induit la production de l'Ang II et de l'ET-1 au niveau des cellules endothéliales et des CMLV (Keynan *et al.*, 2004; Lavrentyev *et al.*, 2007). De plus, Sodhi et ses collaborateurs (2003) ont observé une augmentation d'expression du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau des CMLV exposées à une forte concentration de glucose (Sodhi *et al.*, 2003). Ils ont également révélé que des artères mésentériques, d'un modèle de rat diabétique de type 2, présentait une plus grande réponse contractile suite à une stimulation à l'ET-1 en comparaison aux artères mésentériques de rats témoins (Sachidanandam *et al.*, 2006).

## **5. Récepteurs aux facteurs de croissance**

Les peptides vasoactifs tels que l'ET-1 et l'Ang II relaient leurs effets mitogéniques par les récepteurs aux facteurs de croissance tels qu'EGF-R et PDGF-R (Daub *et al.*, 1996; Saito and Berk, 2001). Les récepteurs à tyrosine kinase sont des protéines à un seul passage transmembranaire comprenant un domaine de liaison au ligand dans sa partie extracellulaire et un domaine à tyrosine kinase dans sa partie intracellulaire (Alberts *et al.*, 2002). La liaison du ligand à son récepteur induit une homo- ou une hétérodimérisation de ce dernier. Cette dimérisation est essentielle pour l'activité tyrosine kinase du récepteur (Alberts *et al.*, 2002). Une fois que le récepteur est activé et dimérisé, il recrute des protéines cibles qui initient la cascade de signalisation qui régule les facteurs de transcriptions. Divers facteurs de croissance relaient leurs effets par les récepteurs à activité à tyrosine kinase, comme EGF et PDGF (Alberts *et al.*, 2002).

### **5.1 Récepteurs au facteur de croissance épidermique**

Le récepteur au facteur de croissance EGF-R et son ligand EGF ont été identifiés par Cohen en 1962 et 1980 (Cohen, 1962; Cohen *et al.*, 1980). EGF fait partie de la famille EGF qui comprend également le TGF- $\alpha$  et le HB-EGF. EGF est la forme soluble

provenant de la protéolyse de son précurseur membranaire (Lee *et al.*, 1995). Ce facteur de croissance est produit par divers types cellulaires parmi lesquelles ont retrouvés les cellules endothéliales, les CMLV et les fibroblastes (Cohen, 1960). Tous les membres de la famille EGF se lient aux récepteurs EGF-R, aussi appelés erbB1 (Prigent and Lemoine, 1992). Le récepteur EGF-R fait partie d'une famille de récepteurs tyrosine kinase appelée erbB. Cette famille comprend également erbB2, erbB3 et erbB4 (Roepstorff *et al.*, 2008). La liaison d'EGF à son récepteur entraîne une homodimérisation du récepteur EGF-R ou une hétérodimérisation du récepteur EGF-R avec les autres membres de la famille erbB (Xian, 2007).

## **5.2 Récepteurs au facteur de croissance dérivé des plaquettes**

Le facteur de croissance PDGF a été identifié dans le sérum sanguin comme étant un facteur de croissance pour les CMLV, les fibroblastes et les cellules gliales (Kohler and Lipton, 1974; Ross *et al.*, 1974; Westermark and Westesson, 1976). Chez l'humain, le PDGF est composé de quatre chaînes polypeptidiques, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D. Ces chaînes polypeptidiques se lient entre elles par des ponts disulfures afin de former des dimères (Johnsson *et al.*, 1982). Ces dimères forment différentes combinaisons, c'est-à-dire PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC et PDGF-DD (Bergsten *et al.*, 2001; Gilbertson *et al.*, 2001; Heldin *et al.*, 2002). Les PDGF se lient à deux types de récepteurs tyrosine kinase, PDGF-R $\alpha$  et PDGF-R $\beta$  (Andrae *et al.*, 2008). Les récepteurs au PDGF forment également des homo- ou hétérodimères tels que, PDGF-R $\alpha\alpha$ , PDGF-R $\beta\beta$  et PDGF-R $\alpha\beta$  (Heldin and Westermark, 1999). Le récepteur PDGF-R $\alpha$  lie avec une grande affinité les chaînes PDGF-A et PDGF-B alors que le récepteur PDGF-R $\beta$  ne se lie qu'à la chaîne PDGF-B. Donc, les récepteurs PDGF $\alpha\alpha$  et PDGF $\alpha\beta$  lient PDGF-AA, PDGF-AB et PDGF-BB, alors que les récepteurs PDGF $\beta\beta$  lient uniquement PDGF-BB (Hammacher *et al.*, 1989; Kanakaraj *et al.*, 1991; Seifert *et al.*, 1989).

### **5.3 Mécanisme de signalisation des récepteurs EGF-R et de PDGF-R**

La liaison des facteurs de croissance tels qu'EGF et PDGF à leurs récepteurs induit une dimérisation de ces derniers ainsi qu'une autophosphorylation sur leur résidu tyrosine intracellulaire (Ferguson *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 1991). Cette autophosphorylation active le récepteur kinase et procure des sites d'arrimages pour la fixation de protéines de signalisation (Kazlauskas and Cooper, 1989; Roepstorff *et al.*, 2008). La liaison entre le récepteur et ses protéines de signalisation implique des interactions protéine-protéine par des domaines spécifiques. Par exemple, les régions d'homologie avec Src (SH2 pour Src homology regions 2) et la région liant les tyrosines phosphorylées (PTB pour phosphotyrosine-binding) sont des domaines qui reconnaissent les tyrosines phosphorylées. Les domaines SH3 reconnaissent les régions riches en prolines. La région d'homologie avec pleckstrin (PH pour pleckstrin homology) est un domaine qui reconnaît les membranes de phospholipide alors que le domaine PDZ reconnaît les séquences spécifiques pour le C-terminale (Heldin *et al.*, 1998). Les cascades de signalisations relayées par EGF-R et par PDGF-R sont la voie ras-MAPK, la voie PLC $\gamma$ -PKC et la voie PI3K-AKT (Andrae *et al.*, 2008; Roepstorff *et al.*, 2008; Scaltriti and Baselga, 2006) (figure 13).

#### ***La voie de ras-MAPK***

EGF-R et PDGF-R active la voie ras-MAPK à l'aide des protéines adaptatrices, Grb2 et Sos (Scaltriti and Baselga, 2006). Sos active ras amenant ainsi l'activation de Raf-1 et de la cascade des MAPK (Andrae *et al.*, 2008; Batzer *et al.*, 1994; Hallberg *et al.*, 1994; Liebmann, 2001). L'activation des MAPK conduit à la stimulation de la croissance cellulaire, la différenciation et à la migration cellulaire (Hill and Treisman, 1995; Seger and Krebs, 1995).

### ***La voie de PI3K-AKT***

La seconde voie de signalisation empruntée par les récepteurs EGF-R et PGF-R est la voie PI3K-AKT (Scaltriti and Baselga, 2006). Le PI3K est une famille d'enzyme qui phosphoryle les phosphoinositides. Les effecteurs de la voie PI3K incluent les kinases sérine/thréonine telles que AKT/PKB (Burgering and Coffey, 1995; Franke *et al.*, 1995), quelques membres de la famille atypique des PKC (Akimoto *et al.*, 1996), la kinase p70S6 (Chung *et al.*, 1994), le JNK (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997) et les petites protéines G de la famille Rho (Hawkins *et al.*, 1995). L'activation de la voie PI3K-AKT par les récepteurs EGF-R et PDGF-R stimule la réorganisation de l'actine, l'inhibition de l'apoptose, le mouvement et la croissance cellulaire (Hu *et al.*, 1995; Shaw and Cantley, 2006; Vivanco and Sawyers, 2002).

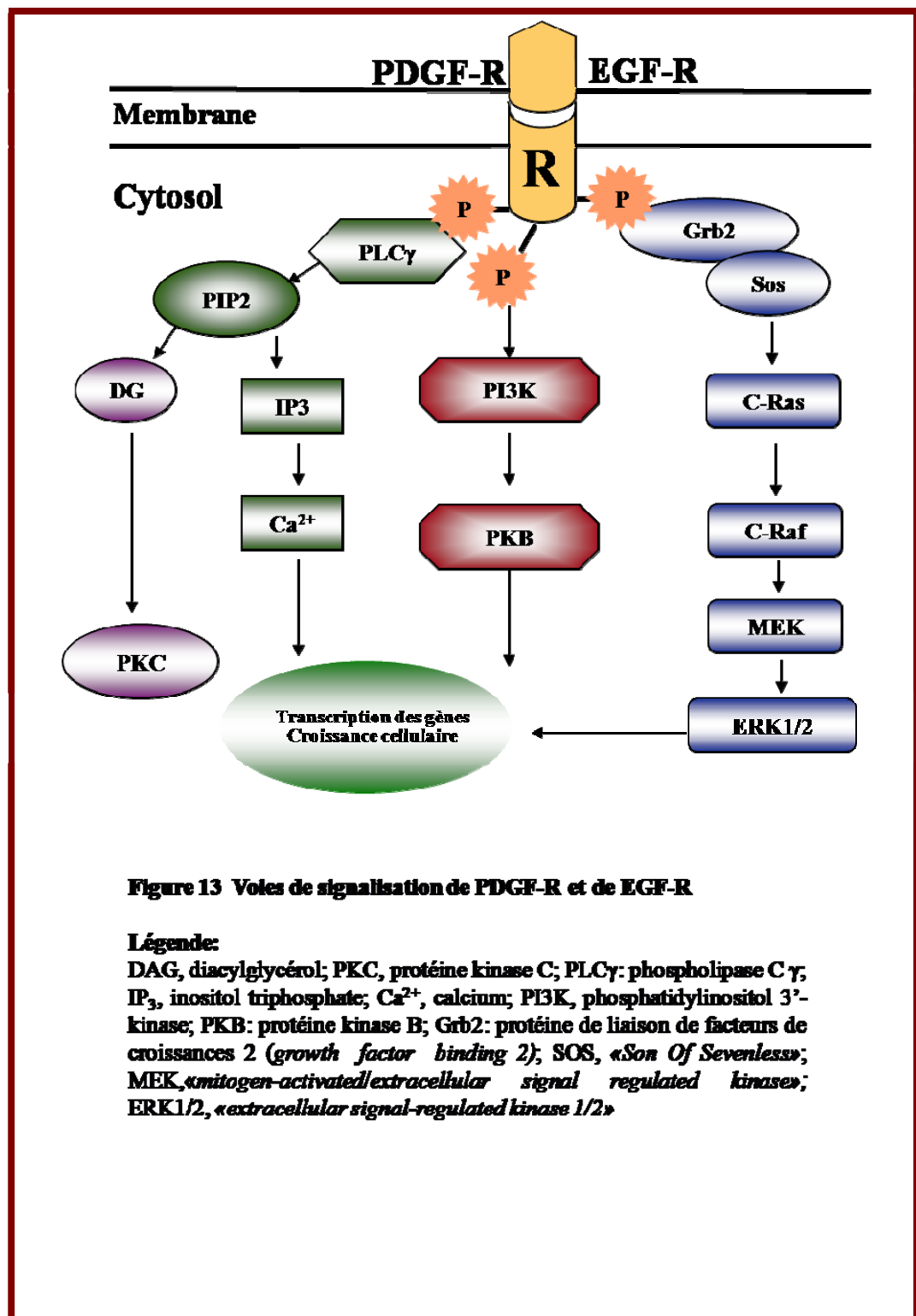
### ***La voie de PLC $\gamma$***

Finalement, la PLC $\gamma$  se lie aux récepteurs EGF-R et PDGF-R. Cette liaison résulte à l'activation de la PLC $\gamma$  par la phosphorylation (Tallquist and Kazlauskas, 2004). L'activation de la PLC $\gamma$  engendre la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation des PKC (Bridges and Lindsley, 2008; Chattopadhyay *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2005). L'activation d' EGF-R et de PDGF-R par la PLC $\gamma$  affecte la stimulation de la croissance cellulaire et de la motilité (Kundra *et al.*, 1994).

### ***La voie de c-Src***

Les récepteurs aux facteurs de croissance peuvent interagir avec d'autres molécules de signalisations entre autres c-Src (Scaltriti and Baselga, 2006). c-Src est le membre le mieux caractérisé d'une famille constituée de neuf protéines kinases cytoplasmiques qui participent dans la transduction de signal des facteurs de croissance (Bolen *et al.*, 1992). c-Src est une protéine de 60 kDa composé de deux domaines de liaisons, SH2 et SH3, un domaine kinase, un domaine non catalytique dans le C-terminale et une séquence de myristoylation dans le N-terminale (Bolen *et al.*, 1992). Le

résidu Tyr 530 semble jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de c-Src. La phosphorylation du Tyr 530 par la kinase Src C-terminal (Csk, pour C-terminal Src kinase) inhibe l'activité de c-Src, alors que la déphosphorylation de ce résidu semble être un mécanisme activation de c-Src (Klages *et al.*, 1994). L'activité de c-Src est également inhibée par les interactions intramoléculaires entre le domaine catalytique C-terminale et les deux domaines SH2 et SH3 (Cooper and Howell, 1993). c-Src qui est localisé dans le cytosol active plusieurs substrats, incluant la protéine kinase d'adhésion focale, le PI3K et les protéines transducteurs de signal et activateurs de transcription (STAT, pour signal transducers and activators of transcription) (Summy and Gallick, 2006; Yeatman, 2004). Bien que c-Src fonctionne d'une manière indépendante, il peut agir comme un transducteur de signal pour EGF-R, PDGF-R et également il peut activer ces récepteurs (Leu and Maa, 2003). Il joue aussi le rôle de médiateur dans la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance par les RCPG (Prenzel *et al.*, 2000). c-Src joue un rôle important dans la la fonction cellulaire incluant la prolifération, la différenciation, la survie et la migration (Prenzel *et al.*, 2000).



#### 5.4 EGF-R et PDGF-R dans le diabète et l'hyperglycémie

Plusieurs évidences démontrent l'implication des récepteurs à l'EGF et au PDGF dans le dysfonctionnement vasculaire qui est associé au diabète/hyperglycémie (Campbell *et al.*, 2003; Kawano *et al.*, 1993; Belmadini *et al.*, 2008). Des études



menées par Campbell et ses collaborateurs (2003) démontrent que l'exposition des CMLV humaines à une forte concentration de glucose augmente l'expression du récepteur PDGF-R $\beta$  et la migration des CMLV. Cette migration induite par le glucose était inhibée par la présence d'un anti-PDGF-R $\beta$  (Campbell *et al.*, 2003). De plus, il a été montré que les CMLV d'aorte de rats STZ prolifèrent plus rapidement que les CMLV de rats témoins. Cette augmentation de prolifération était associée avec la surexpression du récepteur PDGF-R $\beta$  au niveau des CMLV de rats STZ (Kawano *et al.*, 1993). Les artères coronaires et les artères mésentériques isolées des rats (db/db), diabétiques de type 2, démontrent une altération dans leur relaxation dépendante de l'endothélium en réponse au stress mécanique et à l'acétylcholine (Belmadani *et al.*, 2008). Cette aberration était associée avec une diminution de l'expression de la eNOS. Le traitement des rats diabétique avec un inhibiteur du récepteur EGF-R améliore la fonction endothéliale des artères coronariennes et mésentériques des rats db/db (Belmadani *et al.*, 2008).

# **CHAPITRE 2**

## **HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL**

## Hypothèse et objectifs de travail

Dans les conditions de diabète et d'hyperglycémie, plusieurs études démontrent des altérations dans la voie de signalisations de  $G\alpha q$ . Les niveaux d'activité de DAG et des PKC sont augmentés dans différents tissus provenant de modèles de rats STZ et des rats BB. De plus, le traitement des cellules endothéliales aortiques et des CMLV avec une grande concentration de glucose augmente l'activité du DAG et des PKC. Cependant, aucune étude n'a été faite sur les niveaux d'expressions des protéines  $G\alpha q/11$  et des  $PLC\beta$ , protéines qui sont en amont du DAG et des PKC, autant au niveau de l'aorte de rats diabétiques qu'au niveau des CMLV dans des conditions hyperglycémiques. Basé sur ces résultats, nous avons émis l'hypothèse suivante : puisque le DAG et les PKC sont augmentés dans les conditions diabétiques et hyperglycémiques, les niveaux d'expression protéique de  $G\alpha q/11$  devraient également augmenter dans ces mêmes conditions. Afin de tester cette hypothèse, nous avons 1- examiné l'effet de l'hyperglycémie sur les niveaux d'expression protéique de  $G\alpha q/11\alpha$  et de leur signalisation et 2- étudié le mécanisme moléculaire par lequel l'hyperglycémie module la voie de signalisation de  $G\alpha q$  dans les CMLV. En utilisant les cellules A10 (CMLV provenant d'aorte thoracique de rat embryonnaire) et à l'aide d'immunobuvardage de type western, nous avons déterminé les niveaux d'expression protéique de  $G\alpha q/11$  et de  $PLC\beta$ , alors que les taux d' $IP_3$  ont été mesurés par l'incorporation de [*myo*-2- $^3H$ ]inositol. Les taux d'anion superoxyde ont été mesurés à l'aide de la lucigénine.

Dans un premier temps, nous avons voulu examiner si l'hyperglycémie pouvait également augmenter l'expression des protéines  $G\alpha q/11$  et des  $PLC\beta$  dans les CMLV. Il a été observé que les niveaux plasmatiques de l'ET-1 et de l'Ang II sont élevés chez les diabétiques de type 1 et 2 et dans les modèles expérimentaux diabétiques. De plus, les cellules endothéliales et CMLV en culture en présence d'une grande concentration de

glucose produisent de l'Ang II et de l'ET-1. Nous avons donc examiné l'implication des récepteurs, AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sur les taux de Gαq/11 et des PLCβ dans les conditions hyperglycémiques.

Plusieurs études indiquent une association entre l'augmentation du stress oxydatif et le diabète/l'hyperglycémie. L'augmentation de l'activité du DAG et des PKC induite par l'hyperglycémie ou au niveau des tissus de modèles diabétiques sont attribuées à l'augmentation du stress oxydatif. Dans un deuxième temps, nous avons étudié si l'augmentation du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie pouvait altérer les molécules associés à la voie de Gαq dans les CMLV.

Dans un troisième temps, puisqu'il a été observé que l'hyperglycémie transactive les récepteurs aux facteurs de croissance tels qu'EGF-R et PDGF-R, nous avons étudié l'implication d'EGF-R et de de PDGF-R dans l'altération de Gq/11α et de leurs signalisation induite par l'hyperglycémie au niveau des CMLV.

# CHAPITRE 3

**High glucose increases the expression of Gq/11 and PLC $\beta$  proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells**

**Magda Descorbeth and Madhu B. Anand-Srivastava**

Article publié dans Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2008

Nov;295(5):H2135-42. Epub 2008 Sep 26

**High glucose increases the expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells**

**Running head:** High glucose modulates Gq $\alpha$  signaling

Magda Descorbeth and Madhu B. Anand-Srivastava

Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal

Montreal, Quebec, Canada

**Address correspondence and reprint request to:**

Madhu B. Anand-Srivastava, PhD.  
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  
E-mail: madhu.anand-srivastava@umontreal.ca

## **ABSTRACT**

The levels and activity of protein kinase C (PKC) and diacylglycerol (DAG) were shown to be up-regulated in diabetes/hyperglycemia; however, studies on the expression of upstream signaling molecules of phosphatidyl inositol (PI) turnover were lacking. The present study was therefore undertaken to examine, if hyperglycemia/diabetes could also modulate the expression of Gq $\alpha$  and phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) proteins and associated PI turnover signaling in aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) and A10 VSMC exposed to high glucose. Aortic VSMC from STZ-diabetic rats exhibited an increased expression of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$ -1 proteins (60% and 30% respectively) as compared to control cells as determined by Western blotting. Pre-treatment of A10 VSMC with high glucose (26 mM) for 3 days also augmented the levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 proteins by about 50, 35, 30 and 30 % respectively as compared to control cells which were restored to control levels by endothelin-1 (ET-1), ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> and angiotensin II (Ang II) AT<sub>1</sub> receptor antagonists. In addition, ET-1-stimulated IP<sub>3</sub> formation was also significantly higher in VSMC exposed to high glucose, whereas the basal levels of IP<sub>3</sub> were not different between the two groups. Furthermore, treatment of A10 VSMC with Ang II and ET-1 also increased significantly the levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins which were restored towards control levels by ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and AT<sub>1</sub> receptor antagonists. These results suggest that high glucose augments the expression of Gq/11 $\alpha$ , PLC $\beta$  and -mediated signaling in VSMC which may be attributed to AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors.

**Keywords:** High glucose; Gq $\alpha$  protein; PLC $\beta$ ; PI turnover; Vascular smooth muscle cells

## INTRODUCTION

Vascular complications including increased contractility and cell proliferation are most common complications in diabetes and chronic hyperglycemia seems to be an important contributing factor in this process. Various signaling mechanisms such as adenylyl cyclase/cAMP, phosphatidyl inositol (PI) turnover and mitogen activated protein kinase (MAPK) have been shown to be implicated in the regulation of vascular tone as well as proliferation and aberration of these mechanisms may contribute to vascular complications in hyperglycemia/diabetes. Guanine nucleotide regulatory proteins (G-proteins) play an important role in the regulation of these signaling mechanisms. Adenylyl cyclase activity is regulated by inhibitory ( $G_i$ ) and stimulatory ( $G_s$ ) guanine nucleotide regulatory proteins, whereas,  $G_q$  family of G-proteins regulate PI turnover signaling. The G-proteins are heterotrimeric proteins and are composed of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. The activation of  $G_q\alpha$  by a G-protein coupled receptor (GPCR) stimulates  $PLC\beta$  which hydrolyzes inositol biphosphates ( $PIP_2$ ) to produce the intracellular second messengers; inositol triphosphates ( $IP_3$ ) and diacylglycerol (DAG) (5; 33). The  $IP_3$  stimulates the release of the calcium ( $Ca^{2+}$ ) from the intracellular stores and DAG activates the protein kinase C (PKC). The release of intracellular calcium activates the calcium channels localized in the cell membrane and allowing the uptake of extracellular calcium inside the cell (27). There exist four distinct genes in the  $G_q\alpha$  subgroup to encode  $G_q\alpha$ ,  $G_{11\alpha}$ ,  $G_{14\alpha}$ ,  $G_{16\alpha}$ .  $G_q\alpha$  and  $G_{11\alpha}$  are 88 % identical and are expressed ubiquitously (36).

Alterations in the levels of  $G_q\alpha$  and associated signaling components result in the impaired cellular functions resulting in various pathological states including diabetes, hypertrophy etc (8). A genetic ablation of  $G_q\alpha$  in mice has been shown to result in a cardiac malformation and craniofacial defects (28), whereas, an overstimulation of  $G_q$  pathway in mice was shown in the development of hypertrophic



cardiomyopathy (8). An enhanced expression of Gq $\alpha$ , PKC and DAG was reported in different tissues from STZ-induced diabetic rats as well as in Bio-Breeding (BB) rats (12; 18; 32; 37; 40). In addition high glucose treatment of cultured aortic endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMC) has also been reported to enhance the activity of PKC and DAG (18; 30; 39). However, the studies on the levels of Gq $\alpha$ , an important upstream signaling molecule of PI turnover in diabetic aorta or in VSMC under hyperglycemic conditions are lacking.

Vasoactive peptides such as Ang II and ET-1, which can be synthesized locally in vasculature, have been implicated in diabetes-associated vascular dysfunctions including vascular remodelling, hypertrophy and proliferation of VSMC (10; 13; 20; 25; 31; 35), leading to an impaired relaxation to vasodilators or exacerbated response to vasoconstrictors. The levels of ET-1 and Ang II have been shown to be elevated in plasma from both type 1 and type 2 diabetes and also in experimental models (7; 15; 22) as well as in aortic endothelial and smooth muscle cells in the presence of high glucose (19; 21; 29) which may contribute to the vascular complications of diabetes.

The present study was undertaken to examine if high glucose could also increase the expression of Gq $\alpha$  proteins and -mediated signaling in A10 VSMC, and whether the increased expression of Gq $\alpha$  is attributed to increased levels of vasoactive peptides. We have provided the first evidence that high glucose increases the expression of Gq/11 $\alpha$  in A10 VSMC which may be due to the increased levels of Ang II and ET-1 induced by high glucose.

## MATERIALS AND METHODS

Endothelin-1 (ET-1), angiotensin II (Ang II), BQ123, BQ788 and losartan were purchased from Sigma. The antibodies Gq $\alpha$ (K-17), G11 $\alpha$ (D-17), PLC $\beta$ -1(D-8), PLC $\beta$ -2 (Q-15) and PLC $\beta$ -3 (C-20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol was purchased from Perkin Elmer (Boston, Massachusetts, USA). All other chemical were purchased from Sigma chemical Co. (St-Louis, Missouri, USA).

***Animal preparation:*** Male Sprague-Dawley (SD) rats (200g) (6-8 weeks-old) were maintained on standard rat chow and tap water *ad libitum* with 12h light/dark cycles in a quiet environment. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 60 mg/kg body wt), dissolved in sodium citrate buffer (pH 4.5). Age-matched control rats were injected with an equal volume of buffer solution. Blood glucose levels were monitored from day 1 to day 5 after the injection using a dextrometer (Ames). Streptozotocin-injected rats with blood glucose levels in excess of 26 mM were considered to be diabetic rats (STZ) and used in the study. The blood glucose level of control rats was 5.5 mM. The rats after 5 days of treatment were sacrificed, aorta were dissected out and used for cell culture. All the protocols used in the present study were approved by the comité de déontologie de l'experimentation sur les animaux (CDEA), Canada.

***Cell Culture and incubation:*** A10 VSMC line from embryonic thoracic aorta of rat was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). VSMC from the aorta of the control and diabetic rats were cultured as describe previously (4). The cells were cultured in Dulbeccos's modified Eagle's medium containing normal glucose (5.5 mM), 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic (containing penicillin, streptomycin and amphotrecin B) at 37°C in 95% air and CO<sub>2</sub> as described previously (17). The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and used between passages

5 and 20. The confluent VSMCs after 24 hrs of incubation in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, were exposed to normal glucose (5.5 mM) or high glucose (26 mM) or 26 mM mannitol for different time periods. For the receptor antagonist studies, cells were incubated in the absence or presence of  $10^{-6}$  M BQ123, BQ788 or losartan for the last 24 hrs of the treatment. After incubation, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 200  $\mu$ l lysis buffer (25 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/l NaCl, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 10 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were centrifuged at  $12000\times g$  for 10 min at 4 °C and the supernatants were used for Western blotting.

**Western blotting:** Western blotting of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1,  $\beta$ -2 and  $\beta$ -3 proteins were performed as described previously (3). After SDS-PAGE, the separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) with a semidry transblot apparatus (Bio-Rad) at 15 V for 45 min. After transfer, the membranes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated in PBS containing 3% skim milk at room temperature for 2 h. The blots were then incubated with specific antibodies against different proteins, Gq $\alpha$  (K-17) against Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  (D-17) against G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ 1 (D-8) against PLC $\beta$ -1, PLC $\beta$ 2 (Q-15) against PLC $\beta$ -2, PLC $\beta$ 3 (C-20) against PLC $\beta$ -3 in PBS containing 1.5% skim milk and 0.1% Tween-20 at room temperature overnight. The antigen-antibody complexes were detected by incubating the blots with goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) conjugated with horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. The blots were then washed three times with PBS before reaction with enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagents (Amersham). Quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the Enhanced Laser

Densitometer, LKB Ultrosan XL, and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

**Determination of IP<sub>3</sub> Levels:** The IP<sub>3</sub> levels in VSMC were determined as described earlier (26). The confluent VSMCs were incubated for 24 hrs in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, and were then exposed to high glucose (26 mmol/l) or normal glucose (5.5 mmol/l) for three days. 24 hrs before the termination of the treatment, the cells were incubated with 5 µCi/ml [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol (specific activity 25 Ci/mmol). The cells were washed three times with warm (37°C) Earle's balanced salt solution buffer after removing the cultured medium containing un-incorporated isotope. The cells were further incubated for 30 min in the same buffer containing 20 mM lithium chloride to inhibit the conversion of the inositol phosphates to inositol so that the radiolabeled inositol phosphates could accumulate within the cells. Agonists were added for 2 hrs and the reaction was terminated by adding 0.9 ml of methanol/chloroform/HCl (40:20:1) as described previously (26). The cells were scraped using a rubber policeman and were then homogenized. Chloroform (0.5 ml) and 0.5 ml distilled water were added to the homogenates, and the samples were then centrifuged to separate lipid and aqueous phases. The aqueous phase was transferred to a column containing 0.8 ml of AG1-X8 resin (200-400 mesh, formate form; obtained from Bio-Rad, Hercules, CA) from which inositol phosphates were eluted sequentially with ammonium formate buffers of increasing molarity (9). The radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. The lipid phase was counted to measure the phosphatidylinositol pool. The accumulation of inositol phosphate was expressed as the ratio of inositol triphosphate to phosphatidylinositol pool  $\times 10^3$  to correct for the variation in the labelling of the lipid pool.

**Statistical Analysis:** Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M and were analyzed by ANOVA in conjunction with Bonferroni test where applicable. Comparisons between

groups (control and high glucose-treated cells) were made with Student's *t*-test for unpaired samples. Difference between groups was considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **The expression of Gq $\alpha$ and PLC $\beta$ proteins in aortic vascular smooth muscle cells from STZ-diabetic rats.**

Since an enhanced expression of PKC and DAG was reported in different tissues from STZ-induced diabetic rats as well as Bio-Breeding (BB) rats (12; 18; 32; 37; 40), it was of interest to investigate if diabetic state could also contribute to the increased expression of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins; the upstream signaling components of DAG and PKC. To investigate this, we examined the levels of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$ -1 proteins in aortic VSMC from 5 day STZ-diabetic rats. As shown in Fig. 1A, the antibodies K-17 against Gq $\alpha$  recognized a single protein of 42 kDa in VSMC from both control and STZ-diabetic rats, however; the expression of Gq $\alpha$  protein was significantly (~60%) increased in VSMC from STZ-diabetic rats as compared to control cells. In addition, the antibodies D-8 against PLC $\beta$ -1 also recognized a single protein of 150 kDa in both groups, however, the expression of PLC $\beta$ -1 was significantly (~30%) increased in VSMC from STZ-diabetic rats as compared to control cells, Fig. 1B. In addition, ET-1-induced IP<sub>3</sub> formation was significantly enhanced in aortic VSMC from STZ-diabetic rats as compared to control rats (data not shown).

### **Effect of high glucose on the expression of Gq $\alpha$ and G11 $\alpha$ proteins in A10 vascular smooth muscle cells.**

Since hyperglycemia simulates the diabetic state, it was of interest to investigate if high glucose could also mimic the effect of diabetes on Gq $\alpha$  protein expression. To test this, the effect of high glucose on the expression of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins was examined in A10 VSMC. As shown in Fig. 2A, the antibodies K-17 against Gq $\alpha$  recognized a single protein of 42 kDa in both control and A10 cells exposed to high glucose for 1 day and 3 days, however; the relative amounts of immunodetectable Gq $\alpha$  was not significantly different in cells exposed to high glucose for 1 day as compared to

control cells exposed to normal glucose (5.5 mM). On the other hand, the expression of Gq $\alpha$  protein was significantly (~50 %) increased in cells exposed to high glucose for three days as compared to control cells. In addition, the antibodies D-17 against G11 $\alpha$  also recognized a single protein of 42 KDa in control and high glucose-treated cells, however, the expression of G11 $\alpha$  was significantly (~40%) increased in cells exposed to high glucose as compared to control cells, (Fig. 2B), On the other hand, the treatment of cells with 26 mM of mannitol for three days did not have any significant effect on the levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins as compared to control cells (Fig.2 C,D).

#### **Effect of high glucose on the expression of PLC $\beta$ isoforms in A10 vascular smooth muscle cells.**

To investigate if high glucose could also increase the expression of PLC $\beta$ , a downstream signaling molecule of Gq $\alpha$  that catalyses the formation of IP<sub>3</sub>, we examined the effect of high glucose on the expression of different isoforms of PLC $\beta$  using specific antibodies. As shown in Fig. 3, the expression of PLC $\beta$ -1 (A) and PLC $\beta$ -2 (B) proteins was significantly (~30%) increased in cells treated with high glucose as compared to control cells, whereas the expression of PLC $\beta$ -3 (C) protein was not altered by this treatment. On the other hand, 26 mM mannitol was ineffective in altering the expression of PLC $\beta$  proteins (Fig.3 D,E).

#### **Effect of high glucose on ET-1-induced IP<sub>3</sub> formation in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).**

To examine if the increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ -1/2 by high glucose was also reflected in functions, the effect of high glucose on IP<sub>3</sub> formation was investigated in A10 VSMC and the results are shown in Fig. 4. ET-1 increased the formation of IP<sub>3</sub> in control and high glucose-treated cells, however, the increase was significantly (~25%) greater in high glucose-treated cells as compared to control cells, whereas the basal IP<sub>3</sub> levels were not significantly different in two groups of cells.

**Implication of endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and angiotensin AT<sub>1</sub> receptors in high glucose-induced enhanced expression of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells.**

Since hyperglycemia/diabetes has been shown to exhibit increased level of vasoactive peptides such as Ang II and ET-1 (7; 15; 19; 21; 22; 29), it was of interest to investigate if high glucose-induced enhanced production of ET-1 and Ang II in VSMC contribute to the increased expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins. To test this, we examined the effect of antagonists of ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> receptor; BQ123 and BQ788 respectively, as well as losartan, AT<sub>1</sub> receptors antagonist, in high glucose-induced increased expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins. The results shown in Fig 5 indicate that BQ123, BQ788 and losartan restored the high glucose-induced increased levels of Gq $\alpha$  (A) and G11 $\alpha$  (B) to control levels, suggesting the implication of ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> and AT<sub>1</sub> receptors in high glucose-induced increased expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC.

The effect of ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> and AT<sub>1</sub> receptor antagonists in high glucose-induced increased expression of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins in A10 cells was also examined and the results are shown in Fig 5 C,D. The increased expression of PLC $\beta$ -1 (C) and PLC $\beta$ -2 (D) proteins by high glucose was restored to control levels by BQ123, BQ788 and losartan suggesting the contribution of ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> and AT<sub>1</sub> receptors in high glucose-induced enhanced expression of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins in A10 VSMC.

**Effect of ET-1 and Ang II on the expression of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells.**

Since AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors appear to be implicated in high glucose-induced increased levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ , it was of interest to investigate if the invitro treatment of A10 VSMC with Ang II and ET-1 could also result in the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ . Results shown in Fig. 6 indicate that pre-treatment of



A10 VSMC with ET-1 ( $10^{-7}$ M) or Ang II ( $10^{-6}$ M) for 24 hrs increased the levels of Gq $\alpha$  by about 70 and 85% respectively, whereas about 90 and 160% increase in the levels of G11 $\alpha$  was observed by ET-1 and Ang II respectively. In addition, the levels of PLC $\beta$  proteins were also increased by about 55 and 90% by ET-1 and Ang II respectively, whereas about 60% increase in the levels of PLC $\beta$ -2 was observed by ET-1 and 80% by Ang II (Fig. 7). Furthermore, the enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ 1/2 induced by Ang II and ET-1 were restored towards control levels by losartan, BQ123 and BQ788 suggesting the implication of AT $_1$  and ET $_A$ /ET $_B$  receptors in Ang II and ET-1-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC.

## DISCUSSION

We have previously reported that A10 VSMC exposed to high glucose (26 mM) decreased the expression of  $G_{i\alpha}$  protein (16). In addition, aortic VSMC from STZ-diabetic rats as well as STZ-diabetic aorta were also shown to exhibit decreased expression of  $G_{i\alpha}$ . (17). DAG/PKC, downstream signaling molecules in  $G_{q\alpha}$  pathway, have been shown to be up-regulated in hyperglycemia and diabetes (12; 18; 30; 32; 37; 39; 40). An enhanced expression of PKC and DAG has been reported in different tissues from STZ-induced diabetic as well as Bio-Breeding (BB) rats (12; 18; 32; 37; 40). In addition, high glucose treatment of cultured aortic endothelial and VSMC has also been reported to enhance the activity of PKC and DAG (18; 30; 39), however, the studies on the levels of  $G_{q\alpha}$ , an important upstream signaling molecule of PI turnover in diabetic aorta or in VSMC under hyperglycemic condition are lacking. In the present study, we demonstrate for the first time that treatment of A10 VSMC with high glucose significantly increased the expression of  $G_{q/11\alpha}$ . The up-regulation of  $G_{q\alpha}$  and  $G_{11\alpha}$  proteins was not due to increased osmolarity because mannitol (26 mM), did not have any effect on the expression of  $G_{q/11\alpha}$  proteins. In addition, we also report that aortic VSMC from STZ-diabetic rats also exhibit increased expression of  $G_{q\alpha}$  proteins, suggesting that hyperglycemia could mimic the diabetic state. An increased expression of  $G_{q\alpha}$  in sciatic nerves (12) and hearts (37; 40) from STZ-diabetic rats has also been reported. However, our results are in contrast with the studies of Ceccarelli et al (6) who showed a decreased expression of  $G_{q\alpha}$  in bovine retinal pericytes exposed to 25 mmol/l of glucose (6). In addition, an unaltered or a decreased expression of  $G_{q/11\alpha}$  protein was also shown in gastric VSMC from 10 weeks STZ-diabetic and a genetic model of non-insulin-dependent diabetes (11-12 months) WBN/Kob diabetic rats (24) respectively. The apparent discrepancies may be attributed to the difference in the cell type used and their origin.

We showed for the first time that the treatment of A10 VSMC with high glucose increased the expression of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2, but not PLC $\beta$ -3 proteins. In addition, aortic VSMC from STZ-diabetic rats also exhibited increased expression of PLC $\beta$ -1 proteins. Our results are in accordance with the studies of Frecker H. et al. (11) who also did not observe any changes in the levels of PLC $\beta$ -3. We also showed that high glucose enhanced ET-1-induced formation of IP $_3$  to a greater extent compared to control cells without increasing basal IP $_3$ . In support of this notion, Abebe and MacLeod (1) using aorta from STZ-diabetic rats have also reported that norepinephrine-induced, but not basal, formation of IP $_3$  was greater as compared to control rats during contraction. In addition, the arteries from STZ-induced diabetic rats were shown to be more responsive to the contractile effects of norepinephrine than the arteries from control animals (2) which may also be due to the increased formation of IP $_3$  induced by norepinephrine. Taken together, it may be suggested that the increased level of IP $_3$  induced by ET-1 in our studies and the norepinephrine-induced enhanced contraction in STZ rats (1; 2) may be attributed to the increased levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ -1/2 proteins which after activation by ET-1 or norepinephrine contribute to the enhanced production of IP $_3$ . On the other hand, the inability of high glucose to increase the levels of IP $_3$  despite increasing the levels of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$  may be due to the fact that the Gq $\alpha$  needs to be activated to form IP $_3$  and this activation occurs by G-protein coupled receptor activation and not by glucose.

The mechanism by which high glucose increases the levels of Gq/11 $\alpha$ , PLC $\beta$  and-mediated signaling is not clear. However, we showed for the first time that Ang II and ET-1 whose levels are augmented in hyperglycemia (19; 21; 29) may contribute to the enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins and -mediated signaling observed in the present studies. This notion is supported by our results showing that losartan; a selective AT $_1$  receptor antagonist, BQ123 as well as BQ788, ET $_A$  and ET $_B$  receptor

antagonists respectively, completely prevented high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  protein in VSMC and suggest that these effects may be mediated by an autocrine production of Ang II and ET-1. In this regard, the local production of Ang II and ET-1 as well as the receptor expression of AT<sub>1</sub> were shown to be significantly increased in aortic endothelial and VSMC exposed to high glucose (19; 21; 29; 34). Furthermore, Ang II has also been shown to increase the synthesis of ET-1 in VSMC (14). Since high glucose increases the levels of Ang II in VSMC (21), it may be possible that high glucose-induced enhanced production of Ang II may contribute to the increased synthesis of ET-1 in VSMC. In addition, our results showing that treatment of A10 VSMC with Ang II and ET-1 augmented the expression of Gq/11 $\alpha$  as well as PLC $\beta$  proteins which was reversed by losartan, BQ123 and BQ788 further strengthen the implication of AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors in enhanced expression of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins induced by high glucose. The underlying mechanism(s) by which AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/AT<sub>B</sub> receptor activation by high glucose induce vascular dysfunction is not well understood at this time. However, Ang II and ET-1 have been reported to increase oxidative stress by activating NADPH oxidase, an enzyme responsible for the production of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and other reactive oxygen species (ROS) (38). Ang II-induced increased expression of p47(phox) and p22(phox) has also been shown recently in A10 VSMC (23). In addition, the role of oxidative stress in Ang II-induced enhanced expression of G $\alpha$  proteins and associated adenylyl cyclase signaling in A10 VSMC has recently been shown (23). Taken together it may be possible that Ang II-induced enhanced oxidative stress under hyperglycemic conditions also contribute to the enhanced expression of Gq $\alpha$ /PLC signaling. However, that possibility needs to be investigated.

In conclusion, we have provided the first evidence that diabetes/hyperglycemia through AT<sub>1</sub> as well as ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors increases the expression of Gq/11 $\alpha$  and

PLC $\beta$ 1/2 proteins which may be responsible for the ET-1-induced increased IP<sub>3</sub> turnover in VSMC (fig. 8). The increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  results in enhanced production in IP<sub>3</sub> which by increasing the intracellular levels of Ca<sup>2+</sup> may contribute to the vascular complications observed in diabetes (Fig. 8). Thus, it may be suggested that high glucose-induced increased levels of Ang II and ET-1 could be the important factors responsible for the impaired Gq/11 $\alpha$  signaling and resultant vascular complications of diabetes.

## **GRANTS**

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

## REFERENCES

1. **Abebe W and MacLeod KM.** Influence of diabetes on norepinephrine-induced inositol 1,4,5-trisphosphate levels in rat aorta. *Life Sci* 49: L85-L90, 1991.
2. **Abebe W and MacLeod KM.** Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol* 101: 465-471, 1990.
3. **Anand-Srivastava MB, de Champlain J. and Thibault C.** DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am J Hypertens* 6: 72-75, 1993.
4. **Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M and Genest J.** Presence of "Ra" and "P"-site receptors for adenosine coupled to adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 213-219, 1982.
5. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 494: 39-51, 1987.
6. **Ceccarelli F, Rosa MM and Chakravarthy U.** Binding characteristics of ET receptors in retinal pericytes and effects of high glucose incubation. *Curr Eye Res* 23: 263-270, 2001.
7. **Collier A, Leach JP, McLellan A, Jardine A, Morton JJ and Small M.** Plasma endothelinlike immunoreactivity levels in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 15: 1038-1040, 1992.

8. **D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB and Dorn GW.** Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8121-8126, 1997.
9. **Dean NM and Beaven MA.** Methods for the analysis of inositol phosphates. *Anal Biochem* 183: 199-209, 1989.
10. **Ergul A, Johansen JS, Stromhaug C, Harris AK, Hutchinson J, Tawfik A, Rahimi A, Rhim E, Wells B, Caldwell RW and Anstadt MP.** Vascular dysfunction of venous bypass conduits is mediated by reactive oxygen species in diabetes: role of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 70-77, 2005.
11. **Frecker H, Munk S, Wang H and Whiteside C.** Mesangial cell-reduced Ca<sup>2+</sup> signaling in high glucose is due to inactivation of phospholipase C-beta3 by protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F1078-F1087, 2005.
12. **Goraya TY, Wilkins P, Douglas JG, Zhou J and Berti-Mattera LN.** Signal transduction alterations in peripheral nerves from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurosci Res* 41: 518-525, 1995.
13. **Groop PH, Forsblom C and Thomas MC.** Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 1: 100-110, 2005.
14. **Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y and Buhler FR.** Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1: 649-659, 1990.



15. **Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA and Wong NC.**  
Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int* 58: 1534-1545, 2000.
16. **Hashim S, Li Y, Nagakura A, Takeo S and Anand-Srivastava MB.**  
Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 63: 709-718, 2004.
17. **Hashim S, Liu YY, Wang R and Anand-Srivastava MB.** Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem* 240: 57-65, 2002.
18. **Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W and King GL.**  
Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11059-11063, 1992.
19. **Keynan S, Khamaisi M, Dahan R, Barnes K, Jackson CD, Turner AJ and Raz I.** Increased expression of endothelin-converting enzyme-1c isoform in response to high glucose levels in endothelial cells. *J Vasc Res* 41: 131-140, 2004.
20. **Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Suzaki Y, Abe S, Hasegawa T and Tamaki T.** Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogen-activated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). *Biochem Pharmacol* 64: 1521-1531, 2002.

21. **Lavrentyev EN, Estes AM and Malik KU.** Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 101: 455-464, 2007.
22. **Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP and Rohde RD.** The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329: 1456-1462, 1993.
23. **Li Y, Lappas G and Anand-Srivastava MB.** Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi(alpha) proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1922-H1930, 2007.
24. **Lin S, Kajimura M, Takeuchi K, Kodaira M, Hanai H, Nishimura M and Kaneko E.** Alterations of GTP-binding proteins (G $\alpha$  and Gq/11 $\alpha$ ) in gastric smooth muscle cells from streptozotocin-induced and WBN/Kob diabetic rats. *Dig Dis Sci* 45: 1517-1524, 2000.
25. **Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB and Ling BN.** Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 272: 24684-24690, 1997.
26. **Mouawad R, Li Y and Anand-Srivastava MB.** Atrial natriuretic peptide-C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 65: 917-924, 2004.

27. **Neves SR, Ram PT and Iyengar R.** G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639, 2002.
28. **Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI and Wilkie TM.** Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J* 17: 4304-4312, 1998.
29. **Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ and King GL.** Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 49: 1239-1248, 2000.
30. **Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A and Srivastava SK.** Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 54: 818-829, 2005.
31. **Sachidanandam K, Harris A, Hutchinson J and Ergul A.** Microvascular versus macrovascular dysfunction in type 2 diabetes: differences in contractile responses to endothelin-1. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 1016-1021, 2006.
32. **Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S and King GL.** Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 265: E783-E793, 1993.
33. **Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO and Sternweis PC.** Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807, 1991.

34. **Sodhi CP, Kanwar YS and Sahai A.** Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H846-H852, 2003.
35. **Sowers JR and Epstein M.** Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update. *Hypertension* 26: 869-879, 1995.
36. **Strathmann M and Simon MI.** G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9113-9117, 1990.
37. **Tappia PS, Asemu G, Aroutiounova N and Dhalla NS.** Defective sarcolemmal phospholipase C signaling in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 261: 193-199, 2004.
38. **Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F and Schiffrin EL.** Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 22: 1141-1149, 2004.
39. **Williams B, Gallacher B, Patel H and Orme C.** Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46: 1497-1503, 1997.
40. **Yang JM, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW and Juhn YS.** Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med* 31: 179-184, 1999.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1 The expression of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) from STZ-diabetic rats.** Cells lysates of VSMC from STZ-diabetic rats and control rats (CTL) were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq $\alpha$  (A), PLC $\beta$ -1 (B) (upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs control.

**Fig. 2 Effect of high glucose on the expression of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control), 26 mM glucose (high glucose) for 1 and 3 days or 26 mM mannitol for 3 days at 37°C. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq $\alpha$  (A, C), G11 $\alpha$  (B, D) (upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 vs control.

**Fig. 3 Effect of high glucose on the expression of PLC $\beta$  isoforms in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control), 26 mM glucose (high glucose) or 26 mM mannitol for 3 days at 37°C. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PLC $\beta$ -1 (A, D), PLC $\beta$ -2 (B, E) and PLC $\beta$ -3 (C) (upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 vs control.

**Fig.4 Effect of high glucose on ET-1-induced IP<sub>3</sub> formation in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 3 days at 37°C. [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol (5μCi/ml) was added on the 3<sup>rd</sup> day for the last 24 h of the treatment as described in *Methods*. The cells were further incubated in the absence or presence of ET-1 (10<sup>-7</sup> M) for 2 h, and IP<sub>3</sub> formation was determined as described in *Materials and Methods*. The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are the means ± S.E.M. of 3-4 separate experiments performed in triplicate. \*\*\* *P* < 0.001 vs control, ## *P* < 0.01.

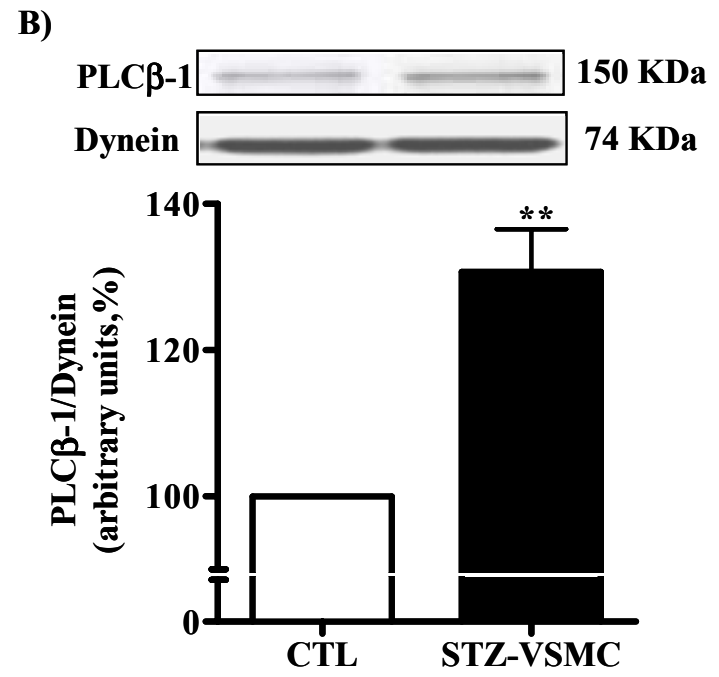
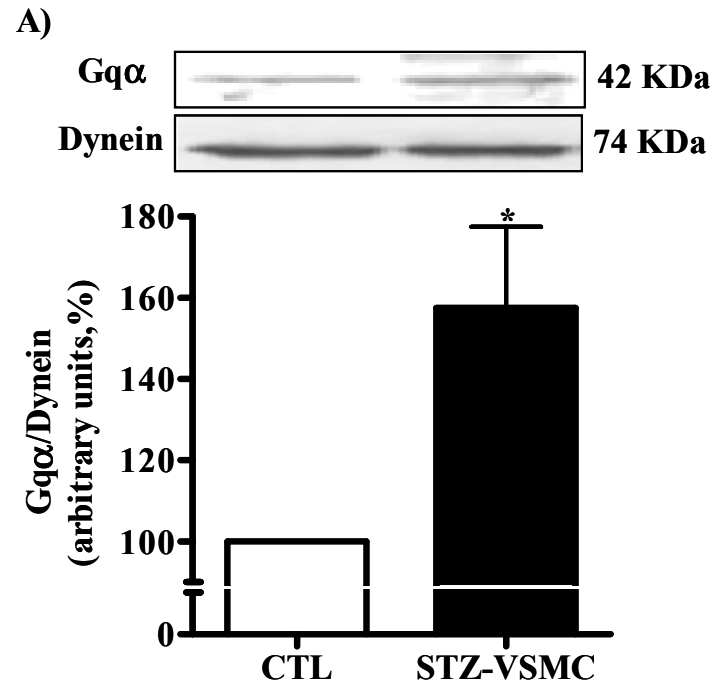
**Fig. 5 Effect of endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists on high glucose-induced enhanced expression of Gqα, G11α and PLCβ proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 3 days at 37°. The antagonists BQ123 (10<sup>-6</sup> M), BQ788 (10<sup>-6</sup> M), or Losartan (10<sup>-5</sup> M) were added on the 3<sup>rd</sup> day for the last 24 h of the treatment. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gqα (A), G11α (B), PLCβ-1 (C) and PLCβ-2 (D) (upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means ± SEM of three separate experiments. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001 vs control. #*P* < 0.05 and ###*P* < 0.001 vs high glucose.

**Fig. 6 Effect of endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists on ET-1 and Ang II-induced enhanced expression of Gqα and G11α protein in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were pretreated without (CTL) or with BQ123 (10<sup>-6</sup> M), BQ788 (10<sup>-6</sup> M), or Losartan (10<sup>-5</sup> M) for 3 h and challenged with ET-1 (10<sup>-7</sup> M) or Ang II (10<sup>-6</sup> M) for 24 h. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gqα (A,C), G11α (B,D) (upper panel)

as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control. # $P < 0.05$  and ## $P < 0.01$  vs ET-1 or Ang II.

**Fig. 7 Effect of endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists on ET-1 and Ang II-induced enhanced expression of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 protein in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).** A10 VSMC were pretreated without (CTL) or with BQ123 ( $10^{-6}$  M), BQ788 ( $10^{-6}$  M), or Losartan ( $10^{-5}$ M) for 3 h and challenged with ET-1 ( $10^{-7}$ M) or Ang II ( $10^{-6}$ M) for 24 h. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PLC $\beta$ -1 (A,C), PLC $\beta$ -2 (B,D) (upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  and ### $P < 0.001$  vs ET-1 or Ang II.

**Fig. 8 Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which hyperglycemia/diabetes increase the expression of Gq $\alpha$ /PLC $\beta$  proteins and result in vascular complications.**



**Figure. 1**



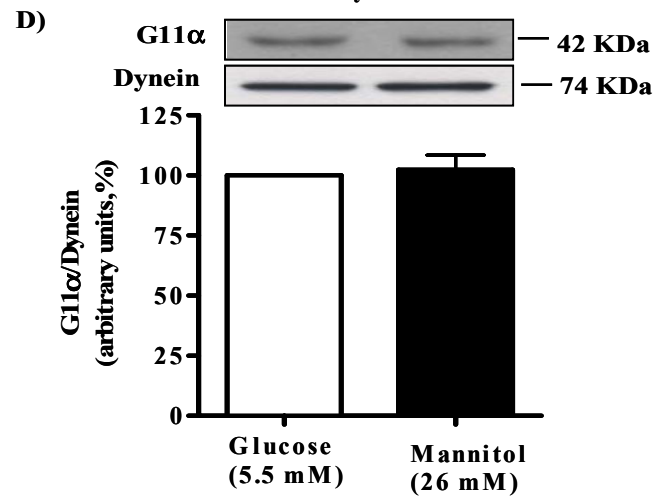
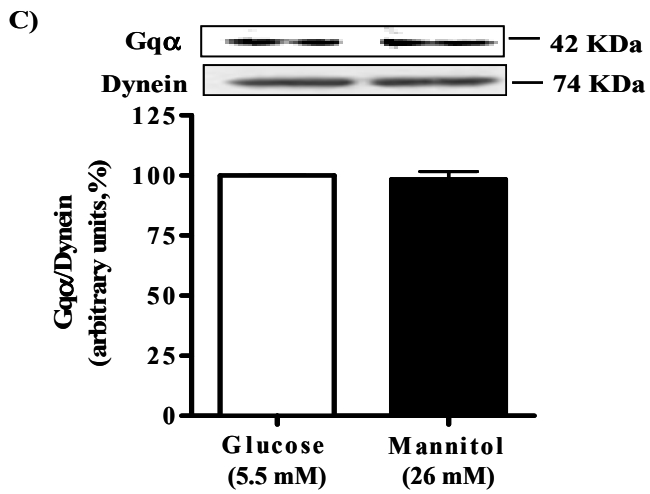
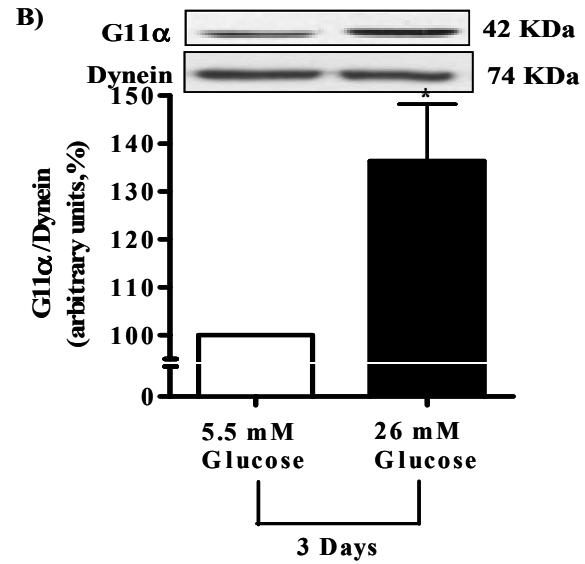
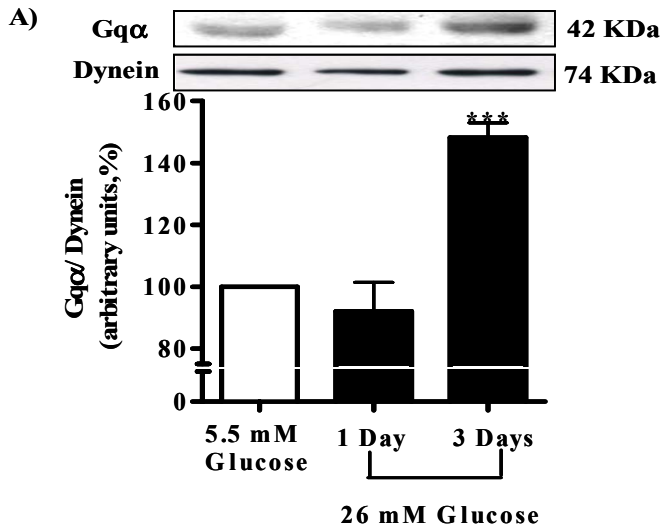


Figure. 2

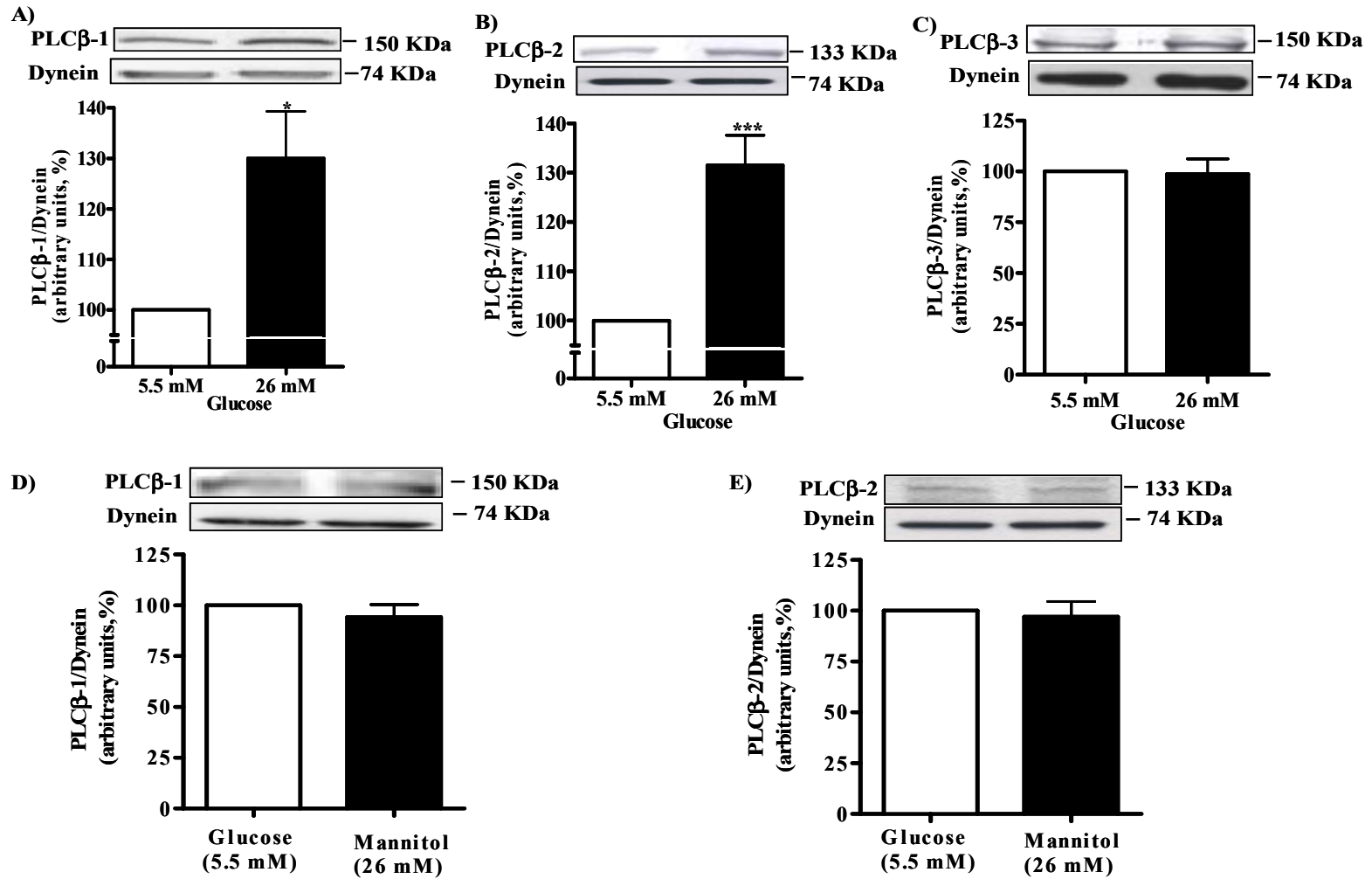


Figure. 3

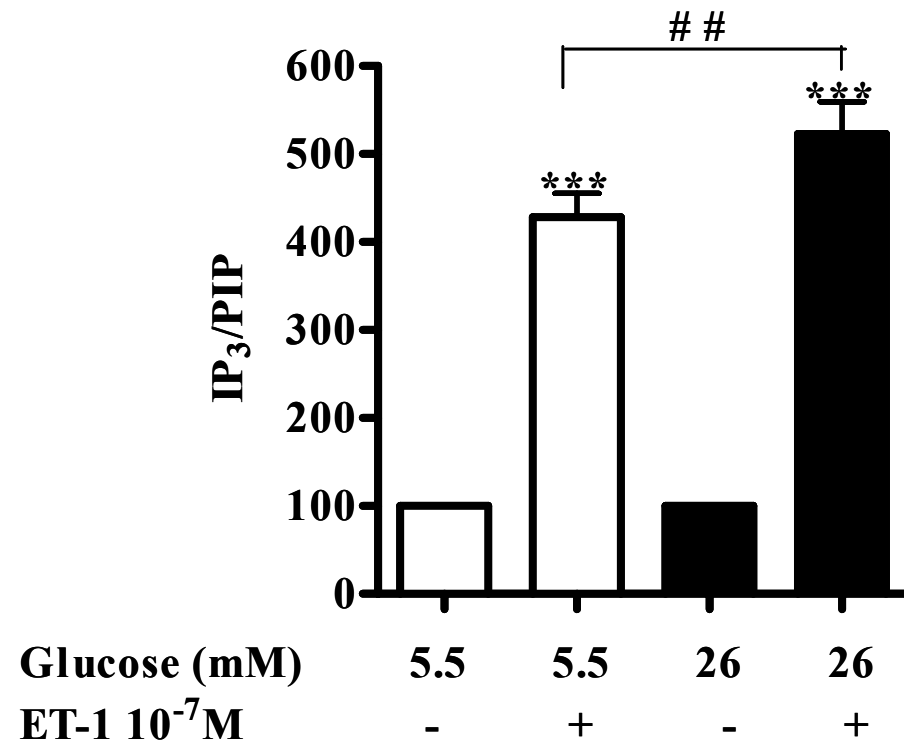
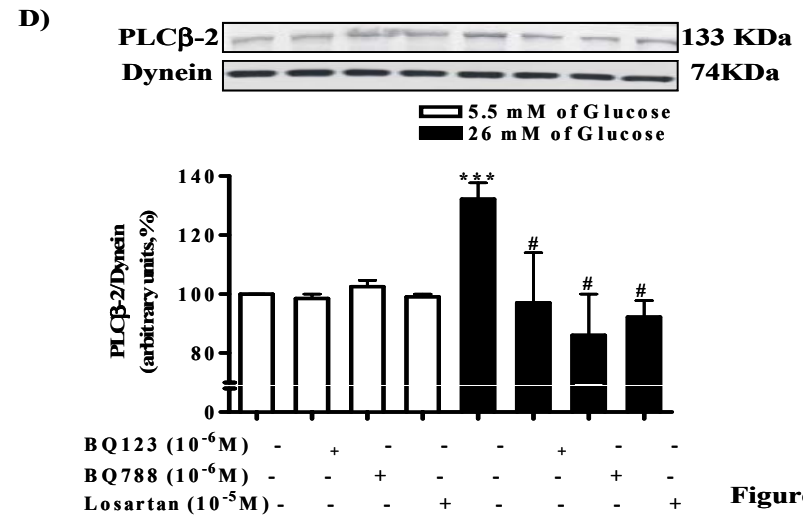
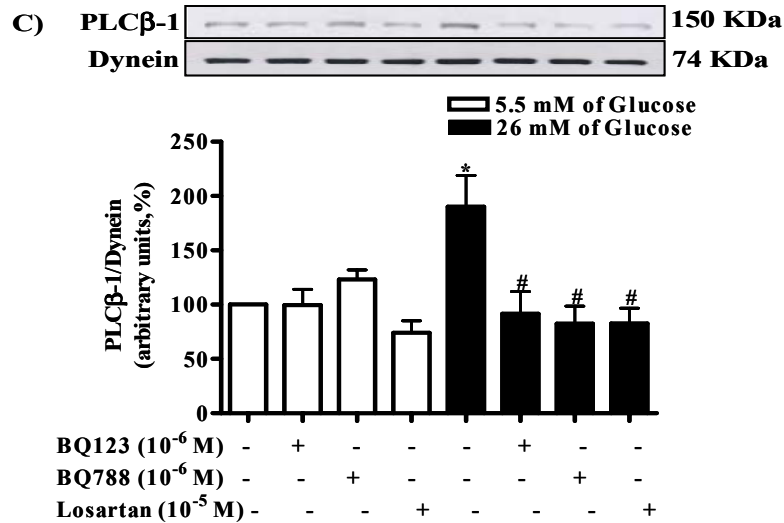
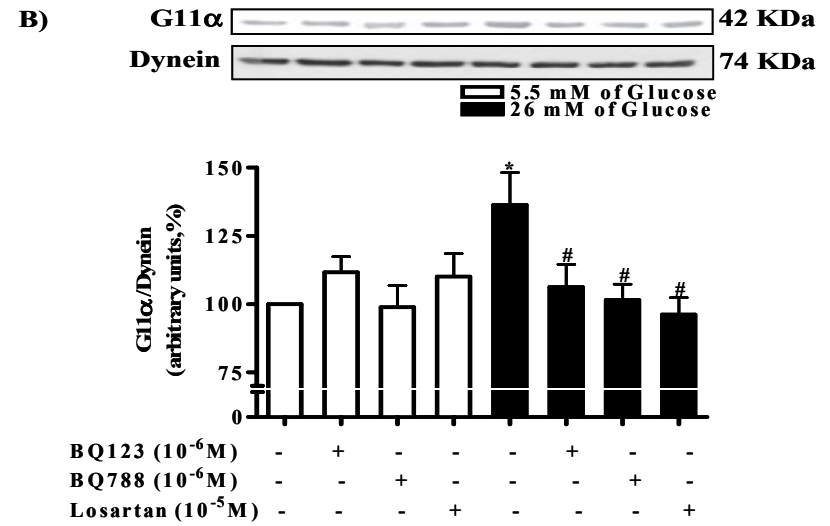
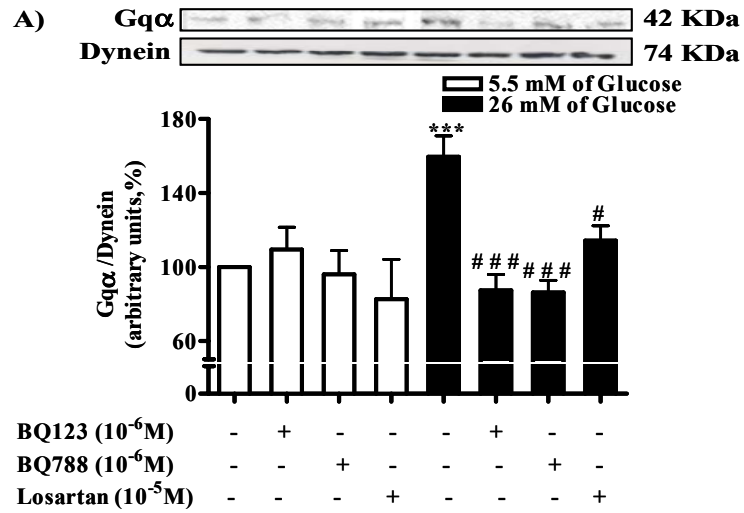
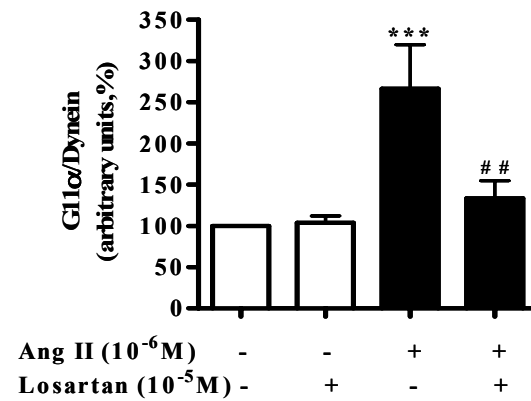
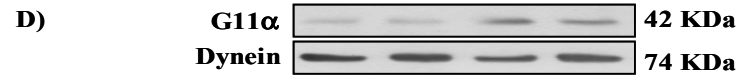
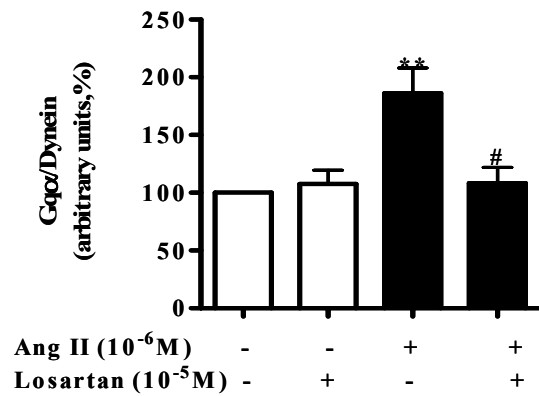
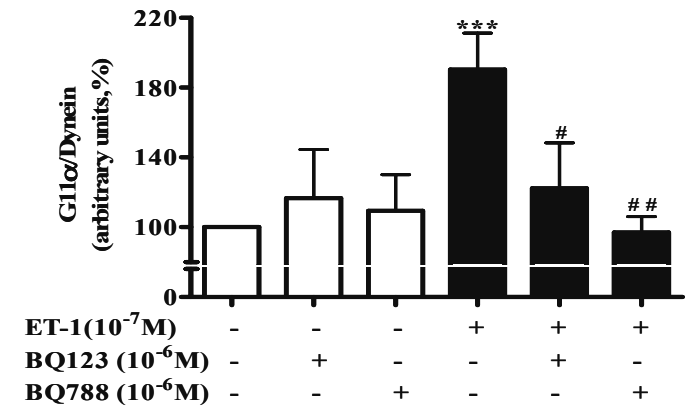
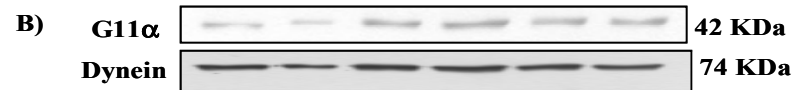
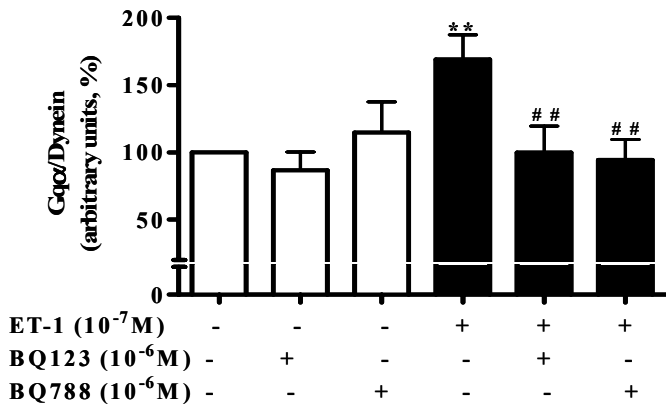
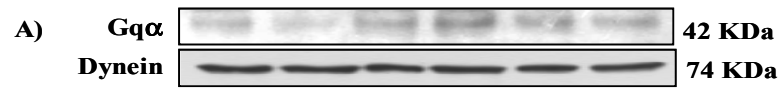


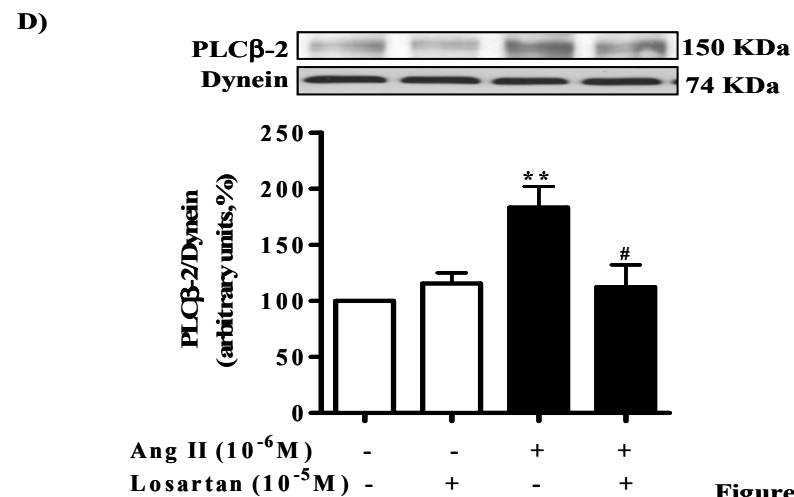
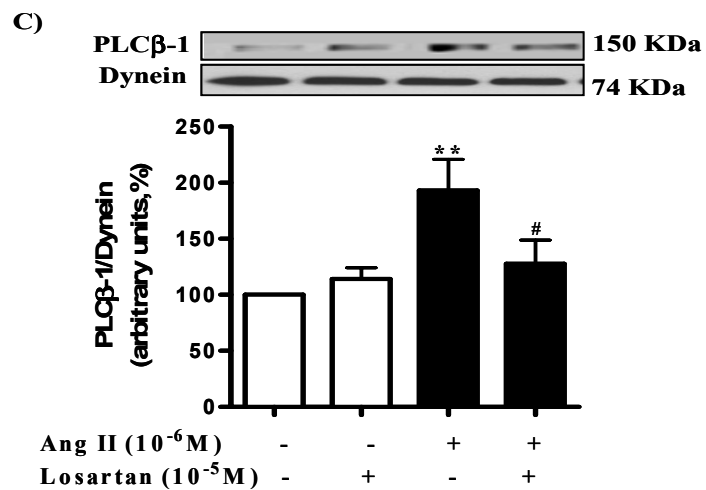
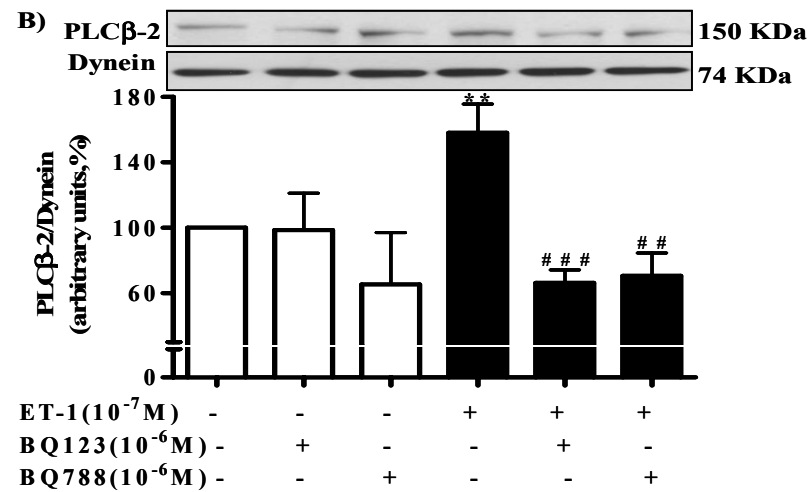
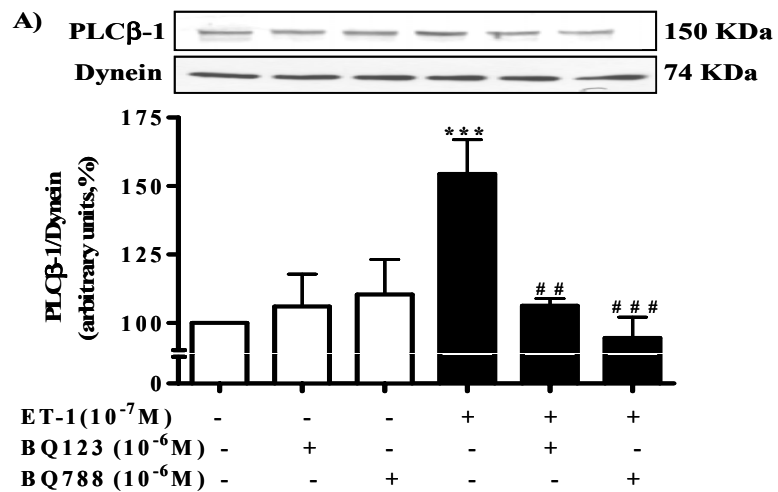
Figure. 4



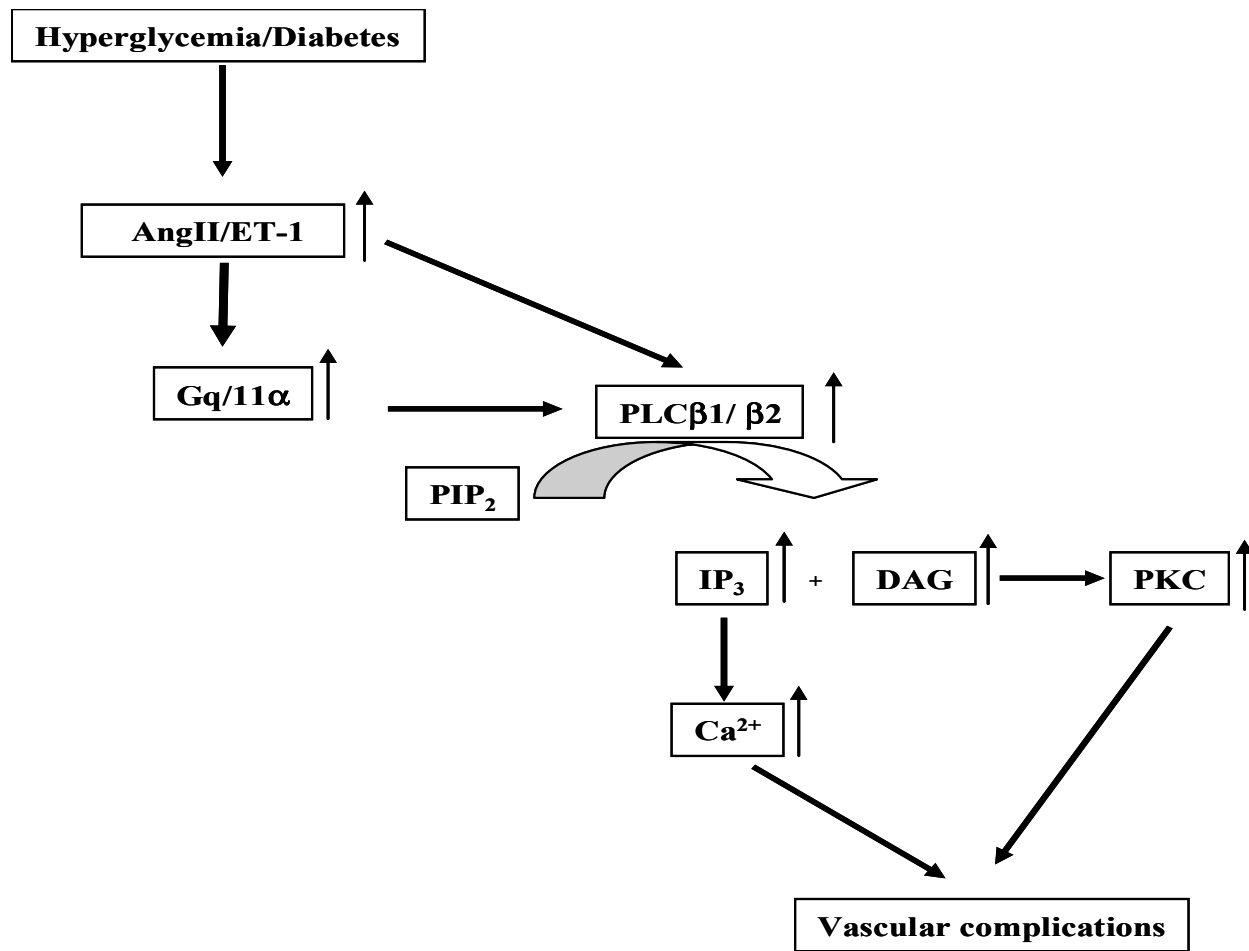
**Figure. 5**



**Figure. 6**



**Figure. 7**



**Figure. 8**

# **CHAPITRE 4**

**Redox modulation of high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$   
proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells**

**Magda Descorbeth and Madhu B. Anand-Srivastava**

Article soumis dans Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. Novembre 2008



**Redox modulation of high glucose-induced increased expression of  
Gq/11 $\alpha$  proteins and associated signaling in vascular smooth muscle  
cells**

Magda Descorbeth and Madhu B. Anand-Srivastava

Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal

Montreal, Quebec, Canada

**Running head:** Oxidative stress and high glucose –induced Gq $\alpha$  signaling

**Address correspondence and reprint request to:**

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

**ABSTRACT** We have recently shown that A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose exhibited enhanced expression of Gq $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins. Since high glucose has been reported to induce oxidative stress, the present study was undertaken to investigate the implication of oxidative stress in high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins and associated signaling in A10 VSMC and to explore the mechanism responsible for high glucose induced enhanced oxidative stress. For these studies, the effect of antioxidants on high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins and IP<sub>3</sub> levels were examined in A10 VSMC. The levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins, as determined by western blotting, were significantly increased in A10 VSMCs exposed to high glucose compared with control cells and were restored to control levels by antioxidant diphenyleneiodonium (DPI), and catalase, a scavenger of hydrogen peroxide, but not by <sup>111</sup>Mn-tetralis(benzoic acid porphyrin) (MnTBAP) and uric acid, scavengers of peroxynitrite. Furthermore, the levels of SOD proteins were also augmented by high glucose. In addition, endothelin-1 (ET-1)-stimulated production of IP<sub>3</sub> that was enhanced by high glucose was also restored towards control levels by DPI and catalase. These results suggest that high glucose-induced enhanced oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  protein and signaling. Furthermore, the enhanced production of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), NADPH oxidase activity and enhanced expression of p22<sup>(phox)</sup> and p47<sup>(phox)</sup> proteins induced by high glucose was restored to control levels by losartan and BQ123 and BQ788 the antagonists of angiotensin AT<sub>1</sub> and endothelin-1 ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors respectively. These results suggest that high glucose-induced enhanced levels of endogenous Ang II and ET-1 by increasing oxidative stress due to increase formation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may contribute to the increased levels of Gq/11 $\alpha$  and-mediated signaling in A10 VSMC.

**Keywords:** High glucose; Gq $\alpha$  protein; PLC $\beta$ ; PI turnover; Oxidative stress; VSMC

## INTRODUCTION

Chronic hyperglycemia is an important contributing factor in impaired contractility and cell proliferation leading to various cardiovascular complications associated with diabetes (11; 20). However, the precise mechanism(s) responsible for hyperglycemia-induced vascular dysfunction remains poorly characterized. Guanine nucleotide regulatory proteins (G-proteins) play an important role in the regulation of vascular tone and aberration of these mechanisms may contribute to vascular complications in hyperglycemia/diabetes.

Adenylyl cyclase activity is regulated by inhibitory ( $G_i$ ) and stimulatory ( $G_s$ ) guanine nucleotide regulatory proteins, whereas,  $G_q$  family of G-proteins regulate PI turnover signaling. The G-proteins are heterotrimeric proteins and are composed of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. G-protein coupled receptor (GPCR) activates the  $G_q\alpha$  which stimulates  $PLC\beta$  and hydrolyzes inositol biphosphates ( $PIP_2$ ) to inositol triphosphates ( $IP_3$ ) and diacylglycerol (DAG) (4; 37). The  $IP_3$  stimulates the release of the calcium ( $Ca^{2+}$ ) from the intracellular stores and DAG activates the protein kinase C (PKC). The release of intracellular calcium leads to an activation of the calcium channels localized at the cell surface thus allowing the uptake of extracellular calcium inside the cell (29). Molecular cloning has been revealed four distinct genes to encode  $G_q\alpha$ ,  $G_{11\alpha}$ ,  $G_{14\alpha}$ ,  $G_{16\alpha}$  in the  $G_q\alpha$  subgroup.

Diabetes-induced alterations in enhanced expression and activity of  $G_q\alpha$ , PKC and DAG have been reported in different tissues from STZ-induced diabetic rats as well as in Bio-Breeding (BB) rats (13; 15; 36; 41; 45). In addition high glucose treatment of cultured aortic endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMC) has also been reported to enhance the activity of PKC and DAG (15; 34; 43). We have recently shown that high glucose induced an increased expression of  $G_q/11\alpha$ ,  $PLC\beta-1$  and  $PLC\beta-2$  proteins, the upstream signaling molecules of PI turnover, in VSMC (10). The

increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ -1/2 by high glucose also resulted in enhanced formation of IP<sub>3</sub> by ET-1 in high glucose-treated cells (10).

The increased oxidative stress has been shown to be associated with hypertension and other cardiovascular diseases including diabetes (2; 3; 7; 44). The enhanced activity/levels of protein PKC and DAG induced by high glucose VSMC have been shown to be attributed to the increased oxidative stress (21). Furthermore, the levels of various vasoactive peptides including Ang II and ET-1 which are augmented in diabetes and under hyperglycemic conditions (14; 19; 23; 24; 32) may also contribute to the enhanced oxidative stress in diabetes/hyperglycemia, because these vasoactive peptides have been shown to increase oxidative stress by increasing the activity of NADPH oxidase (42). In this regard, Ang II-induced increased production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and enhanced expression of Nox<sup>4</sup> and p47<sup>(phox)</sup>; different components of NADPH oxidase has been reported (26). We have recently shown that treatment of A10 VSMC with high glucose augmented the levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ -1/2 which were attributed to AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors. Since Ang II increased the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, it may be possible that high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  proteins in VSMC may also be attributed to increased oxidative stress. To examine this possibility, the present study was undertaken to determine the effect of antioxidants on high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  proteins and associated signaling in A10 vascular smooth muscle cells and to explore the underlying mechanisms responsible for high glucose-induced enhanced oxidative stress.

We showed that high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins and increased formation of IP<sub>3</sub> by ET-1 was reversed to control levels by DPI. In addition it was restored to control level by AT<sub>1</sub> receptor and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonists. These data suggest that high glucose-induced enhanced oxidative stress due

to  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  may contribute to the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins and signaling in VSMC.

## **MATERIALS AND METHODS**

Endothelin-1 (ET-1), BQ123, BQ788 and losartan were purchased from Sigma. [*myo*-2-<sup>3</sup>H] Inositol was purchased from Perking Elmer. Diphenyleneiodonium (DPI) and Leucigenin were purchased from Sigma (St-Louis, Missouri, USA). The antibodies against Gq $\alpha$  (K-17), G11 $\alpha$  (D-17), PLC $\beta$ -1(D-8), PLC $\beta$ -2 (Q-15), p22<sup>(phox)</sup> (C-17) and p47<sup>(phox)</sup> (D-10) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol was purchased from Perkin Elmer (Boston, Massachusetts, USA). All other chemical were purchased from Sigma chemical Co. (St-Louis, Missouri, USA).

### ***Cell Culture and Incubation***

A10 VSMC line from embryonic thoracic aorta of rat was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). The cells were plated in 75-cm<sup>2</sup> flasks and incubated at 37°C in a 95% air/5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (with glucose, L-glutamine, and sodium bicarbonate) containing antibiotics and 10% foetal bovine serum. The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and used between passages 5 and 20. The confluent VSMCs were incubated for 24 hrs in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, then were exposed to normal glucose (5.5 mM) or high glucose (26 mM) for three days. The antioxidants DPI (10  $\mu$ M), <sup>111</sup>Mn-tetralis(benzoic acid porphyrin) (MnTBAP; 20  $\mu$ M), uric acid (100  $\mu$ M), catalase (100 U/ml) and receptor antagonists BQ123 (10<sup>-6</sup>M), BQ788 (10<sup>-6</sup>M) and losartan (10<sup>-5</sup>M) were added after 48 h of glucose treatment. After incubation, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 200  $\mu$ l buffer (25 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/l NaCl, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 10 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 2 mol/l benzamidine, 2 mmol/l ethylenebis (oxyethylenenitrolo)-tetraacetic acid, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100,

0.1% sodium dodecyl sulfate and 0.5 µg/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were centrifuged at 12000×g for 10 min at 4 °C and supernatants were used for Western blotting.

**Western blotting:** Western blotting of Gqα, G11α, PLCβ-1, β-2 and β-3 proteins were performed as described previously (1). After SDS-PAGE, the separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) with a semidry transblot apparatus (Bio-Rad) at 15 V for 45 min. After transfer, the membranes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated in PBS containing 3% skim milk at room temperature for 2 h. The blots were then incubated with specific antibodies against different proteins, Gqα (K-17) against Gqα, G11α (D-17) against G11α, PLCβ1 (D-8) against PLCβ-1, PLCβ2 (Q-15) against PLCβ-2, PLCβ3 (C-20) against PLCβ-3 in PBS containing 1.5% skim milk and 0.1% Tween-20 at room temperature overnight. The antigen-antibody complexes were detected by incubating the blots with goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) conjugated with horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. The blots were then washed three times with PBS before reaction with enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagents (Amersham). Quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the Enhanced Laser Densitometer, LKB Ultrosan XL, and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

#### ***Determination of IP<sub>3</sub> Levels***

The IP<sub>3</sub> levels in VSMC were determined as described earlier (28) The confluent VSMCs were incubated for 24 hrs in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, and were then exposed to high glucose (26mmol/l) or normal glucose (5.5 mmol/l) for three days. 24 hrs before the termination of the treatment, the cells were incubated with 5 µCi/ml [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol (specific activity 25 Ci/mmol) and 10 µM DPI The cells

were washed three times with warm (37°C) Earle's balanced salt solution buffer after removing the cultured medium containing un-incorporated isotope. The cells were further incubated for 30 min in the same buffer containing 20 mM lithium chloride to inhibit the conversion of the inositol phosphates to inositol so that the radiolabeled inositol phosphates could accumulate within the cells. Agonists were added for 2 hrs and the reaction was terminated by adding 0.9 ml of methanol/chloroform/HCl (40:20:1) as described previously (28) The cells were scraped using a rubber policeman and were then homogenized. Chloroform (0.5 ml) and 0.5 ml distilled water were added to the homogenates, and the samples were then centrifuged to separate lipid and aqueous phases. The aqueous phase was transferred to a column containing 0.8 ml of AG1-X8 resin (200-400 mesh, formate form; obtained from Bio-Rad, Hercules, CA) from which inositol phosphates were eluted sequentially with ammonium formate buffers of increasing molarity (9). The radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. The lipid phase was counted to measure the phosphatidylinositol pool. The accumulation of inositol phosphate was expressed as the ratio of inositol triphosphate to phosphatidylinositol pool  $\times 10^3$  to correct for the variation in the labelling of the lipid pool.

#### ***Superoxide anion and NADPH oxidase activity determination***

Basal superoxide anion production in VSMC was measured using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method with low concentration (5  $\mu\text{mol/l}$ ) of lucigenin as described previously (44).

***Statistical Analysis.*** Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M and were analyzed by ANOVA in conjunction with Bonferroni test where applicable. Comparisons between groups (control and high glucose) were made with Student's *t*-test for unpaired samples. Difference between groups was considered statistically significant at  $P < 0.05$ .



## **RESULTS**

### **Effect of antioxidant on high glucose-evoked enhanced expression of Gq and 11 $\alpha$ in A10 vascular smooth muscle cells**

We have recently demonstrated that A10 VSMC exposed to high glucose for 72 hr increased the levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins (10). Since high glucose exhibited enhanced production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> anion and NADPH oxidase activity, it may be possible that high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC is also attributed to the enhanced oxidative stress. To test this, we examined the effect of antioxidants on high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC. As reported earlier (10), the levels of Gq $\alpha$  (Fig. 1A) and G11 $\alpha$  (Fig. 1B) as detected by antibody K-17 and antibody D17 respectively were significantly increased by about 60 and 40 % respectively in high glucose-treated cells and were restored to control levels by DPI, an inhibitor of NADPH oxidase. However, DPI did not have any effect on the levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  in control cells.

### **Effect of antioxidant on high glucose-evoked enhanced expression of PLC $\beta$ 1 and $\beta$ 2 protein in A10 vascular smooth muscle cells**

The effect of DPI on high glucose-induced enhanced expression of PLC $\beta$  a downstream signaling molecule was also examined and the results are shown in Fig. 2. As reported earlier (10) the levels of immunodetectable PLC $\beta$ -1 (2A) and PLC $\beta$ -2 (2B) as detected by antibody D-8 and antibody Q15 respectively were significantly increased by about 30 and 60 % respectively in high glucose-treated cells compared to control cells as determined by densitometric scanning (lower panels). However, the prior treatment of the cells with DPI restored the increased expression of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins to control levels.

### **Effect of antioxidant on high glucose-evoked ET-1-induced enhanced formation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells**

We have earlier shown that ET-1 augmented the production of IP<sub>3</sub> in A10 VSMC exposed to high glucose (10). Since antioxidants restored the high glucose-induced increased levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  as well as PLC $\beta$  proteins toward control levels, it was of interest to examine if this could also result in the restoration of increased formation of IP<sub>3</sub> induced by ET-1. To investigate this, the effect of DPI on ET-1-stimulated increased IP<sub>3</sub> levels was examined in A10 cells exposed to high glucose. The results shown in Fig. 2C indicate that the enhanced IP<sub>3</sub> formation by ET-1 in A10 VSMC exposed to high glucose was decreased by DPI by about 60 % suggesting that ET-1-evoked enhanced production of IP<sub>3</sub> in high glucose-treated cells is also attributed to the enhanced oxidative stress. On the other hand, DPI also attenuated the enhanced production of IP<sub>3</sub> evoked by ET-1 by about 25 % in control cells, suggesting that ET-1-induced IP<sub>3</sub> production is attributed to oxidative stress.

### **Implication of hydrogen peroxide in high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$ and PLC $\beta$ proteins in A10 vascular smooth muscle cells**

The O<sub>2</sub><sup>-</sup> formed by NADPH oxidase is converted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by superoxide dismutase (SOD) which by the action of catalase is converted to H<sub>2</sub>O. On the other hand, O<sub>2</sub><sup>-</sup> can also interact with NO and form cytotoxic peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). The availability of NO has been reported to be decreased in diabetes and under hyperglycaemic conditions (5; 12; 22). To investigate the implication of different reactive oxygen species in high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  proteins, we examined the effect of catalase, a scavenger of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MnTBAP and Uric acid, scavengers of peroxynitrite on high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$ . The results shown in Fig. 3 indicate that the increased expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC induced by high glucose was restored to control levels by

catalase (3A,B) whereas MnTBAP and Uric acid (3C,D), were ineffective in restoring the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  proteins. In addition, the enhanced expressions of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2, were restored to control levels by catalase (4A,B), whereas MnTBAP and Uric acid (4C,D) were unable to restore the enhanced levels of PLC $\beta$  proteins to control levels. These results suggest the implication of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and not peroxynitrite in high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins.

**Effect of catalase on high glucose-evoked ET-1-induced enhanced formation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells**

Since catalase restored the high glucose-induced increased levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  as well as PLC $\beta$  proteins towards control levels, it was of interest to examine if this could also result in the restoration of increased formation of IP<sub>3</sub> induced by ET-1. To investigate this, the effect of catalase on ET-1-stimulated increased IP<sub>3</sub> levels was examined in A10 cells exposed to high glucose. The results shown in Fig. 5 indicate that the enhanced IP<sub>3</sub> formation by ET-1 in A10 VSMC exposed to high glucose was decreased by catalase by about 25 % suggesting that ET-1-evoked enhanced production of IP<sub>3</sub> in high glucose-treated cells is also attributed to the enhanced of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On the other hand, catalase also attenuated the enhanced production of IP<sub>3</sub> evoked by ET-1 by about 60 % in control cells, suggesting that ET-1-induced IP<sub>3</sub> production is attributed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Effect of high glucose on the expression of superoxide dismutase (SOD) in A10 vascular smooth muscle cells.**

To further investigate if high glucose could also increase the expression of SOD, an enzyme responsible for the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, we examined the effect of high glucose on the levels of SOD in A10 VSMC. The results shown in Fig. 6 indicate that the treatment of A10 VSMC with high glucose increased the levels of SOD-1 (6A) by about 30 % but not of SOD-2 (6B).

### **Implication of endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and angiotensin AT<sub>1</sub> receptors in high glucose-induced enhanced production of superoxide anion and NADPH oxidase activity in A10 vascular smooth muscle cells**

We have recently shown that A10 VSMC exposed to high glucose increased the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NADPH oxidase activity (25). Since the levels of various vasoactive peptides including Ang II and ET-1 that increase oxidative stress by activating NADPH oxidase (42) are enhanced in diabetes and under hyperglycemic conditions (14; 19; 23; 24; 32) it may be possible that the increased oxidative stress induced by high glucose may be attributed to the enhanced levels of Ang II and ET-1. To investigate this, the effect of antagonists of ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors; BQ123, BQ788 respectively and AT<sub>1</sub> receptor antagonist; losartan, on high glucose-evoked enhanced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and NADPH oxidase activity was examined in A10 cells. The results shown in Fig.7 demonstrate that O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (7A) and NADPH oxidase activity (7B) that were significantly augmented by about 50 ± 15 % and 50 ± 20 % respectively in A10 VSMC exposed to high glucose were restored to control levels by BQ123, BQ788 and losartan. On the other hand, the receptors antagonists did not have any effect on O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and NADPH oxidase activity in control cells exposed to 5.5 mM of glucose.

### **Effect of high on the expression of p22<sup>(phox)</sup> and p47<sup>(phox)</sup> in A10 vascular smooth muscle cells: implication of endothelin ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and angiotensin AT<sub>1</sub> receptors**

The expression of different components of NADPH oxidase were shown to be upregulated in vascular tissues and kidney from animal models of diabetes as well as in micro and macro vascular tissues in diabetic patients and obese subjects (16-18). It was of interest to investigate if high glucose could also enhance the expression of p22<sup>(phox)</sup> and p47<sup>(phox)</sup> proteins, subunits of NADPH oxidase in A10 VSMC, and if this could be attributed to Ang II and ET-1, we examined the effect of antagonist of AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors on the expression of p22<sup>(phox)</sup> and p47<sup>(phox)</sup> proteins. The results

shown in Fig 8. indicate that high glucose (26 mM) increased the levels of p22<sup>(phox)</sup> (8A) and p47<sup>(phox)</sup> (8B) by about  $35 \pm 3$  and  $30 \pm 4$  % respectively in A10 VSMC and this enhanced expression was restored to control levels by BQ123, BQ788 and losartan.

## DISCUSSION

We have previously reported that A10 VSMC exposed to high glucose exhibited enhanced levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 compared to control cells (10). The up-regulation of Gq $\alpha$ /11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins was not due to increased osmolarity because mannitol (26 mM) did not have any effect on the expression of Gq/11 $\alpha$  proteins (10). The increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins was restored to control levels by ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> and AT<sub>1</sub> receptors antagonists suggesting the implication of AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins (10).

In the present studies, we report that A10 VSMC exposed to high glucose exhibit enhanced activity of NADPH oxidase and augmented production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> that may contribute to the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins. Multiple cellular sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup> have been documented which include NADH/NADPH and xanthine oxidase, the mitochondrial respiratory chain, the arachidonic acid cascades (including lipoxygenase and cyclooxygenase) and microsomal enzymes (6; 8). The contribution of mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> production induced by high glucose has been reported in endothelial cells (30; 33) that plays an important role in the pathogenesis of diabetes-associated endothelial dysfunctions. Whether high glucose-induced enhanced production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in A10 VSMC is attributed to mitochondria needs to be investigated. However, Liu et al. (27) have recently shown that high glucose-induced enhanced production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in VSMC was abolished by O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger tempol or apocynin; a specific inhibitor of NADPH oxidase and unaffected by rotenone; an inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex 1, L-NAME; an inhibitor of nitric oxide synthase or oxypurinol; an inhibitor of xanthine oxidase, which suggest that NADPH oxidase is primarily responsible for high glucose-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in VSMC. The contribution of DAG- protein kinase C (PKC) that activates

NADPH oxidase in the enhanced production of reactive oxygen species (ROS) has been reported in diabetic tissues (18) and in cultured endothelial as well as in aortic VSMC exposed to high glucose (16). In addition, expression of NADPH oxidase components were shown to be upregulated in vascular tissues and kidney from animal models of diabetes as well as in micro and macro vascular tissues in diabetic patients and obese subjects (16-18). We also report that treatment of A10 VSMC with high glucose augmented the levels of p47<sup>(phox)</sup> and p22<sup>(phox)</sup> proteins, the subunits of NADPH. Taken together, it may be suggested that increased levels of NADPH oxidase subunits may be responsible for the enhanced levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NADPH oxidase activity. In this regard, Liu et al. (21) have recently reported that transfection of VSMC with SiRNA-p47<sup>(phox)</sup> abolished hyperglycemia-induced enhanced production of O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

Although a role of oxidative stress in enhanced activity of PKC in diabetes and hyperglycemia has been well established (16-18), evidence for direct role of oxidative stress in high glucose/diabetes-induced enhanced expression of Gq/11α proteins and associated signaling is lacking. Our results showing that DPI, an inhibitor of NADPH oxidase, that has been shown to restore the enhanced levels of O<sub>2</sub><sup>-</sup> induced by high glucose (25) also restored the high glucose-induced increased expression of Gq/11α and PLCβ proteins to control levels suggest the implication of NADPH oxidase/O<sub>2</sub><sup>-</sup> in high glucose-evoked enhanced expression of Gq/11α and PLCβ proteins. In addition, the fact that DPI also restored the ET-1 induced increased levels of IP<sub>3</sub> to control levels further suggests the role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in enhanced PLC signaling activated by ET-1.

Hyperglycemia through the activation of NF-κB has been shown to augment the expression of iNOS, which increases the generation of NO (38). O<sub>2</sub><sup>-</sup> formed by NADPH oxidase activation is converted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by superoxide dismutase (SOD) and also reacts with nitric oxide (NO) to form a potent cytotoxin peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which may be responsible for the enhanced expression of Gq/11α and PLCβ proteins in

hyperglycemia. We showed that high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  protein may not be attributed to the increased levels of peroxynitrite because scavengers of peroxynitrite; uric acid and MnTBAP were not able to restore the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins to control levels. On the other hand, the results showing that catalase restored the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins to control level suggest the implication of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC. In addition, the fact that catalase also attenuated the ET-1 induced increased levels of IP<sub>3</sub> further suggests the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in enhanced PLC signaling activated by ET-1. Furthermore, our results showing that high glucose increased the expression of cytosolic CuZn-SOD (SOD-1) proteins and not mitochondrial Mn-SOD (SOD-2) in A10 VSMC further suggest that the increased production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be attributed to the increased levels of cytosolic SOD (SOD-1) and not mitochondrial SOD (SOD-2). Our results are in accordance with the studies of other investigators who have also shown an increased expression of SOD-1 induced by high glucose in aortic VSMC (35). On the other hand, the decreased expression of catalase and glutathione; scavengers of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, has also been reported in aortic VSMC exposed to high glucose (35; 39; 40). Taken together, it may be suggested that high glucose-induced enhanced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be responsible for the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC exposed to high glucose.

The mechanism by which high glucose enhanced the oxidative stress is not clear. However, it may be possible that the increased levels of various vasoactive peptides including Ang II and ET-1 in diabetes and under hyperglycemic conditions (14; 19; 23; 24; 32) that have been shown to increase oxidative stress by activating NADPH oxidase (42) may contribute to the enhanced oxidative stress, induced by high glucose in VSMC. This notion is substantiated by our studies showing that increased production of



$O_2^-$ , NADPH oxidase activity as well as the enhanced expression of p47<sup>(phox)</sup> and p22<sup>(phox)</sup> proteins by high glucose were restored to control levels by antagonists of AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors. Furthermore, Ang II treatment of VSMC have been shown to increase the production of  $O_2^-$  and the expression of Nox4 and p47<sup>(phox)</sup> (26). In addition, AT<sub>1</sub> receptor blocker candesartan and ACE inhibitor quinapril have been shown to attenuate the enhanced expression of p47<sup>(phox)</sup> in kidney from STZ-diabetic rats, suggesting the implication of Ang II in diabetes-induced increased oxidative stress (31).

In conclusion, we have provided the first evidence that high glucose-induced increased levels of Ang II and ET-1 may contribute to the enhanced production of  $O_2^-$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and results in enhanced oxidative stress which may be responsible for the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  (Fig. 9). The increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  results in enhanced production in IP<sub>3</sub> which by increasing the intracellular levels of Ca<sup>2+</sup> may contribute to the vascular complications observed in diabetes (Fig. 9). From these studies, it may be suggested that antioxidants as well as AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptors antagonists that decrease oxidative stress and thereby improve impaired Gq $\alpha$ /PLC signaling may be used as potential therapeutic agents for the treatment of vascular complication of diabetes.

## **GRANT**

This study was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research [MOP 53074].

## REFERENCES

1. **Anand-Srivastava MB, de Champlain J. and Thibault C.** DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am J Hypertens* 6: 72-75, 1993.
2. **Baynes JW.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412, 1991.
3. **Baynes JW and Thorpe SR.** Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9, 1999.
4. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 494: 39-51, 1987.
5. **Bohlen HG and Nase GP.** Arteriolar nitric oxide concentration is decreased during hyperglycemia-induced betaII PKC activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H621-H627, 2001.
6. **Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820, 2001.
7. **Cai H and Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844, 2000.
8. **Colwell JA.** Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 42: 8-11, 1993.

9. **Dean NM and Beaven MA.** Methods for the analysis of inositol phosphates. *Anal Biochem* 183: 199-209, 1989.
10. **Descorbeth M and Anand-Srivastava MB.** High glucose increased the expression of Gq/11 {alpha} and PLC{beta} proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008.
11. **Giugliano D, Ceriello A and Paolisso G.** Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-267, 1996.
12. **Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C and D'Onofrio F.** Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 95: 1783-1790, 1997.
13. **Goraya TY, Wilkins P, Douglas JG, Zhou J and Berti-Mattera LN.** Signal transduction alterations in peripheral nerves from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurosci Res* 41: 518-525, 1995.
14. **Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA and Wong NC.** Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int* 58: 1534-1545, 2000.
15. **Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W and King GL.** Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic

control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11059-11063, 1992.

16. **Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H and Nawata H.** High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49: 1939-1945, 2000.
17. **Inoguchi T and Nawata H.** NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 6: 495-501, 2005.
18. **Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H and Nawata H.** Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14: S227-S232, 2003.
19. **Keynan S, Khamaisi M, Dahan R, Barnes K, Jackson CD, Turner AJ and Raz I.** Increased expression of endothelin-converting enzyme-1c isoform in response to high glucose levels in endothelial cells. *J Vasc Res* 41: 131-140, 2004.
20. **Koya D and King GL.** Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47: 859-866, 1998.

21. **Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H and King GL.** Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* 43: 1372-1377, 1994.
22. **Lash JM, Nase GP and Bohlen HG.** Acute hyperglycemia depresses arteriolar NO formation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 277: H1513-H1520, 1999.
23. **Lavrentyev EN, Estes AM and Malik KU.** Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 101: 455-464, 2007.
24. **Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP and Rohde RD.** The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329: 1456-1462, 1993.
25. **Li Y, Descorbeth M and Anand-Srivastava MB.** Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of Gi{alpha} proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2845-H2854, 2008.
26. **Li Y, Lappas G and Anand-Srivastava MB.** Role of oxidative stress in angiotensin II-induced enhanced expression of Gi(alpha) proteins and adenylyl cyclase signaling in A10 vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1922-H1930, 2007.

27. **Liu S, Ma X, Gong M, Shi L, Lincoln T and Wang S.** Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 42: 852-863, 2007.
28. **Mouawad R, Li Y and Anand-Srivastava MB.** Atrial natriuretic peptide-C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 65: 917-924, 2004.
29. **Neves SR, Ram PT and Iyengar R.** G protein pathways. *Science* 296: 1636-1639, 2002.
30. **Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I and Brownlee M.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790, 2000.
31. **Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T and Wilcox CS.** Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* 61: 186-194, 2002.
32. **Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ and King GL.** Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 49: 1239-1248, 2000.

33. **Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Drel VR, Obrosova IG and Pacher P.** Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H610-H619, 2007.
34. **Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A and Srivastava SK.** Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 54: 818-829, 2005.
35. **Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, McMaster D, Catherwood MA, McGinty AM and Trimble ER.** Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes* 47: 801-809, 1998.
36. **Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S and King GL.** Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 265: E783-E793, 1993.
37. **Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO and Sternweis PC.** Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807, 1991.
38. **Spitaler MM and Graier WF.** Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45: 476-494, 2002.



39. **Tachi Y, Okuda Y, Bannai C, Bannai S, Shinohara M, Shimpuku H, Yamashita K and Ohura K.** Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue. *Life Sci* 69: 1039-1047, 2001.
40. **Tachi Y, Okuda Y, Bannai C, Okamura N, Bannai S and Yamashita K.** High concentration of glucose causes impairment of the function of the glutathione redox cycle in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 421: 19-22, 1998.
41. **Tappia PS, Asemu G, Aroutiounova N and Dhalla NS.** Defective sarcolemmal phospholipase C signaling in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 261: 193-199, 2004.
42. **Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F and Schiffrin EL.** Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 22: 1141-1149, 2004.
43. **Williams B, Gallacher B, Patel H and Orme C.** Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46: 1497-1503, 1997.
44. **Wu R, Millette E, Wu L and de Champlain J.** Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 741-748, 2001.

45. **Yang JM, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW and Juhn YS.** Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med* 31: 179-184, 1999.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1 Effect of diphenyleneiodonium (DPI) on the expression of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. DPI (10  $\mu$ M) was added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq $\alpha$  (A, upper panel) and G11 $\alpha$  (B, upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.01 vs control, # P<0.05 vs 26 mM Glucose.

**Fig.2 (A,B) Effect of diphenyleneiodonium (DPI) on the expression of PLC $\beta$ 1/2 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. DPI (10  $\mu$ M) was added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PLC $\beta$ -1 (A, upper panel) and PLC $\beta$ -2 (B, upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*P<0.05, \*\* P<0.01 vs control, # P<0.05 vs 26 mM Glucose

**(2C) Effect of diphenyleneiodonium (DPI) on ET-1-induced augmentation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. A10 VSMCs were incubated in the presence of [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol and DPI (10  $\mu$ M) after 48 hrs of glucose treatment and IP<sub>3</sub> formation was determined as described in *Materials and Methods*. Values are means

± SEM of three separate experiments. \*\*\*P<0.001 vs controls, # P<0.05, ### P<0.01 vs ET-1, <sup>0</sup> P<0.05.

**Fig.3 Effect of catalase, MnTBAP and uric acid on the expression of Gq/11α proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. Catalase (100 U/ml) (A,B), MnTBAP (20 μM) or uric acid (100 μM) (C,D) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gqα (A,C, upper panel) and G11α (B,D, upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means ± SEM of three separate experiments. \*\*P<0.01 vs control, # P<0.05 vs 26 mM Glucose.

**Fig.4 Effect of catalase, MnTBAP and uric acid on the expression of PLCβ proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. Catalase (100 U/ml) (A,B), MnTBAP (20 μM) or uric acid (100 μM) (C,D) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PLCβ-1 (A,C, upper panel) and PLCβ-2 (B,D, upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means ± SEM of three separate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control, # P<0.05, ## P<0.01 vs 26 mM Glucose.

**Fig.5 Effect of catalase on ET-1-induced augmentation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°.

A10 VSMCs were incubated in the presence of [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol and catalase (10 μM) after 48 hrs of glucose treatment and IP<sub>3</sub> formation was determined as described in *Materials and Methods*. Values are means ± SEM of three separate experiments. \*\*\*P<0.001 vs controls, # P<0.05, ## P<0.01, vs ET-1, <sup>0</sup> P<0.05.

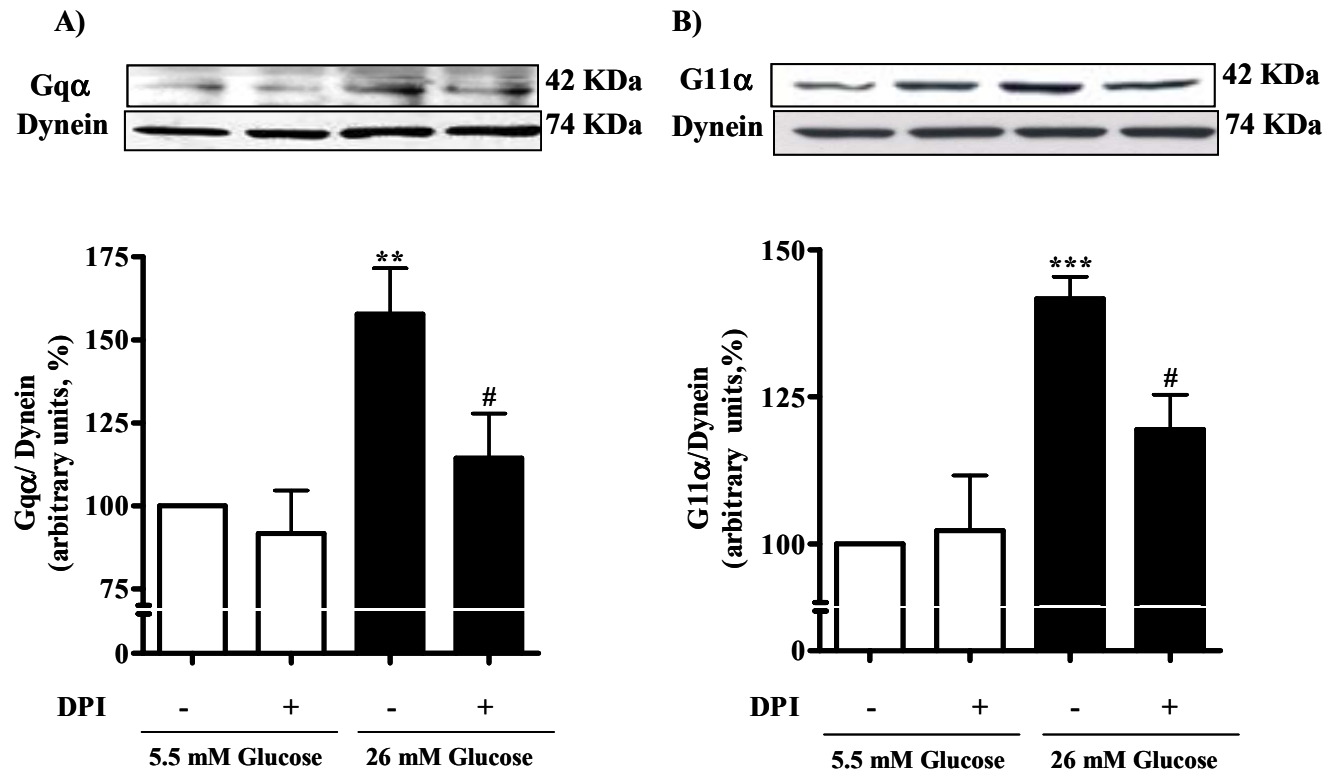
**Fig.6 Effect of high glucose on the expression of SOD proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°C. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against SOD-1 (A, upper panel) and SOD-2 (B, upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means ± SEM of three separate experiments. \*\*\* P<0.001 vs control.

**Fig.7 Effect of AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonists on high-glucose induced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. The antagonists BQ123 (10<sup>-6</sup> M), BQ788 (10<sup>-6</sup> M), or Losartan (10<sup>-5</sup>M) were added after 48 hrs of glucose treatment and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (A) and NADPH activity (B) were determined as described in *Materials and Methods*. The results are expressed as percentages of CTL, taken as 100%. Values are means ± SE of three separate experiments. \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 vs control, # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 vs 26 mM Glucose.

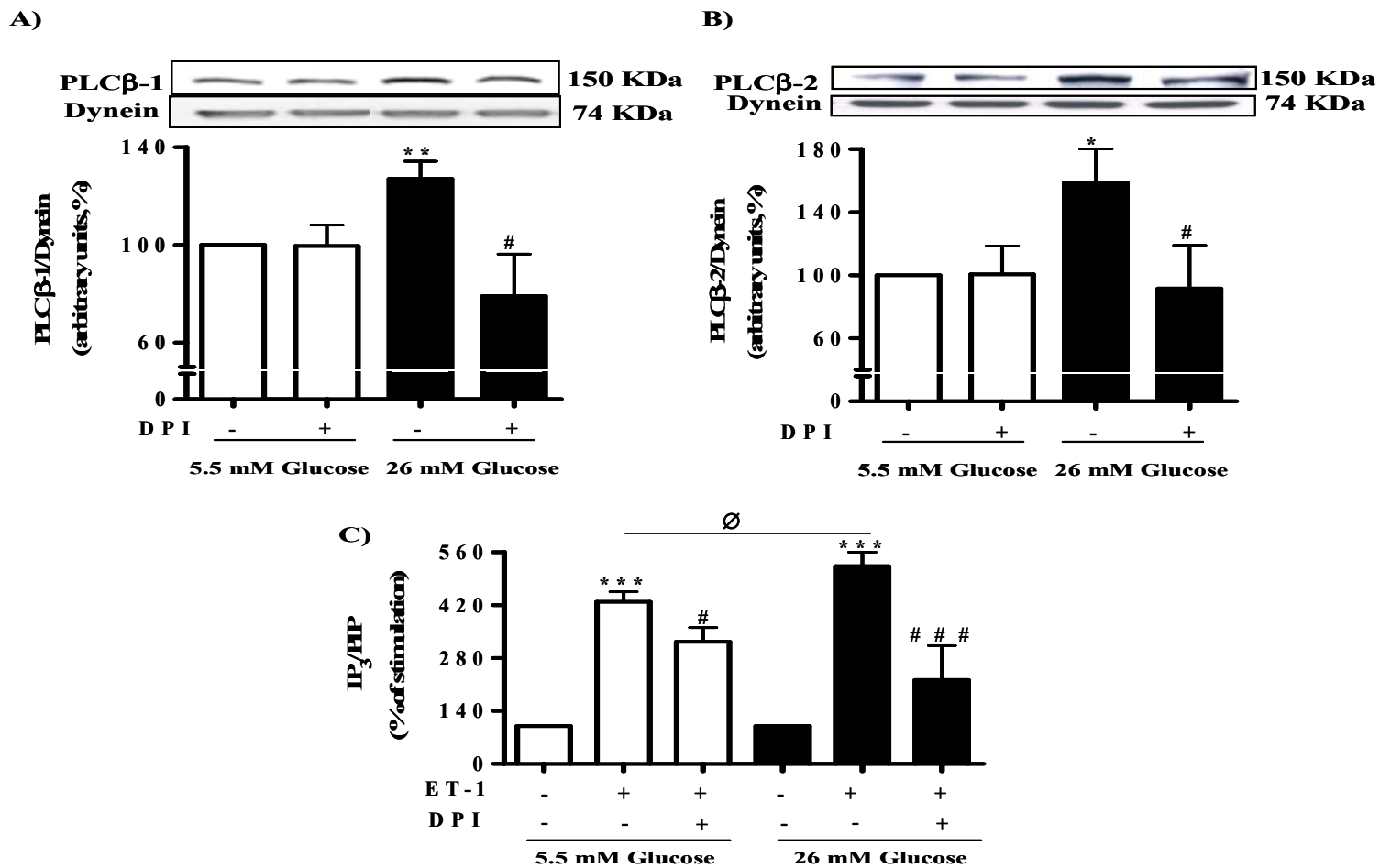
**Fig.8 Effect of AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> receptor antagonists on the expression of p22<sup>(phox)</sup> and p47<sup>(phox)</sup> subunits proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control) or 26 mM glucose (high glucose) for 72 hrs at 37°. The antagonists BQ123 (10<sup>-6</sup> M), BQ788 (10<sup>-6</sup> M), or Losartan (10<sup>-5</sup>M) were added after 48 hrs of

glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against p22<sup>(phox)</sup> (A, upper panel) and p47<sup>(phox)</sup> (B, upper panel) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panel). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs control, # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 vs 26 mM Glucose.

**Fig. 9 Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which hyperglycemia/diabetes increases the expression of Gq/11 $\alpha$  and-mediated cell signalling**



**Figure. 1**



**Figure. 2**



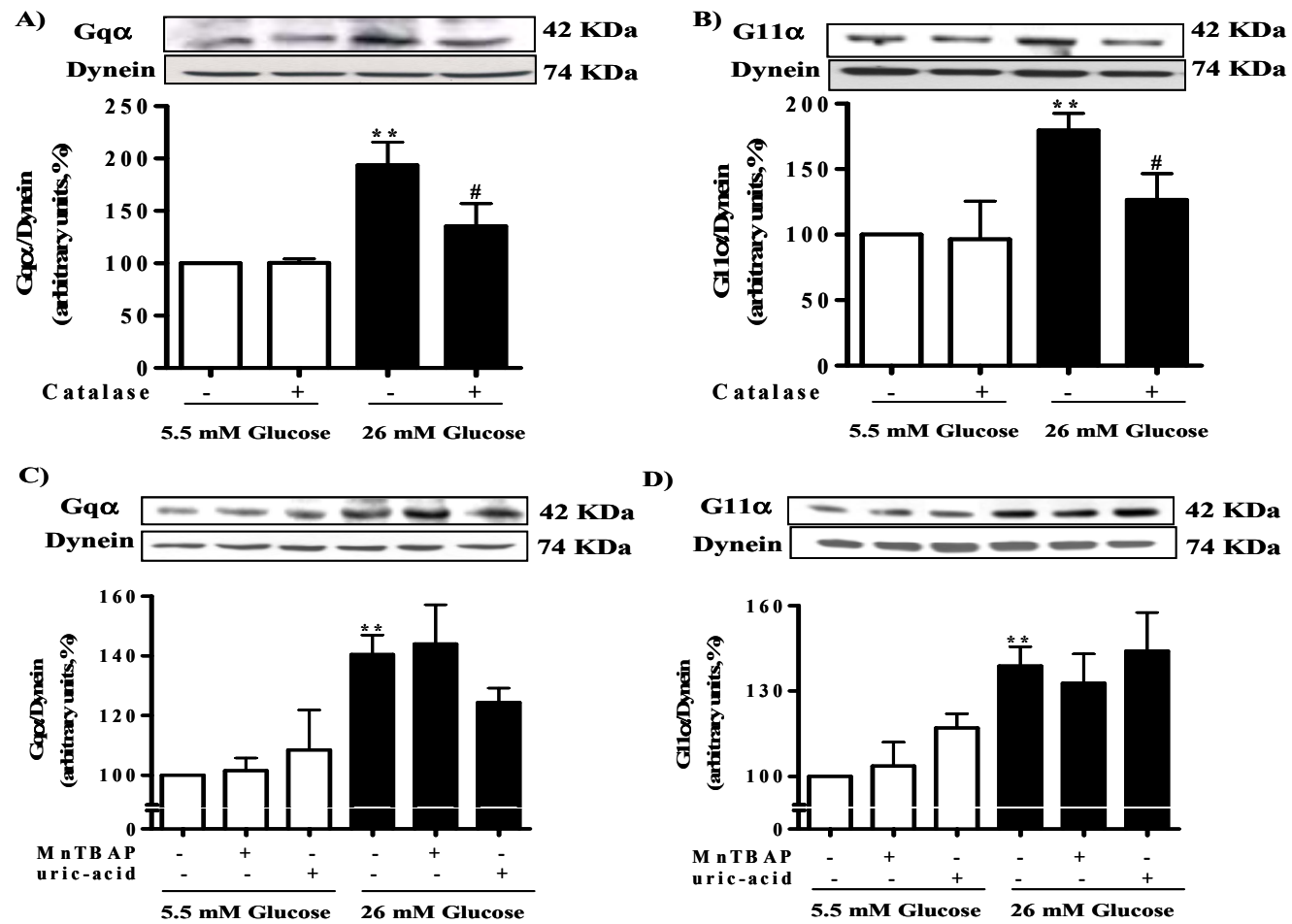
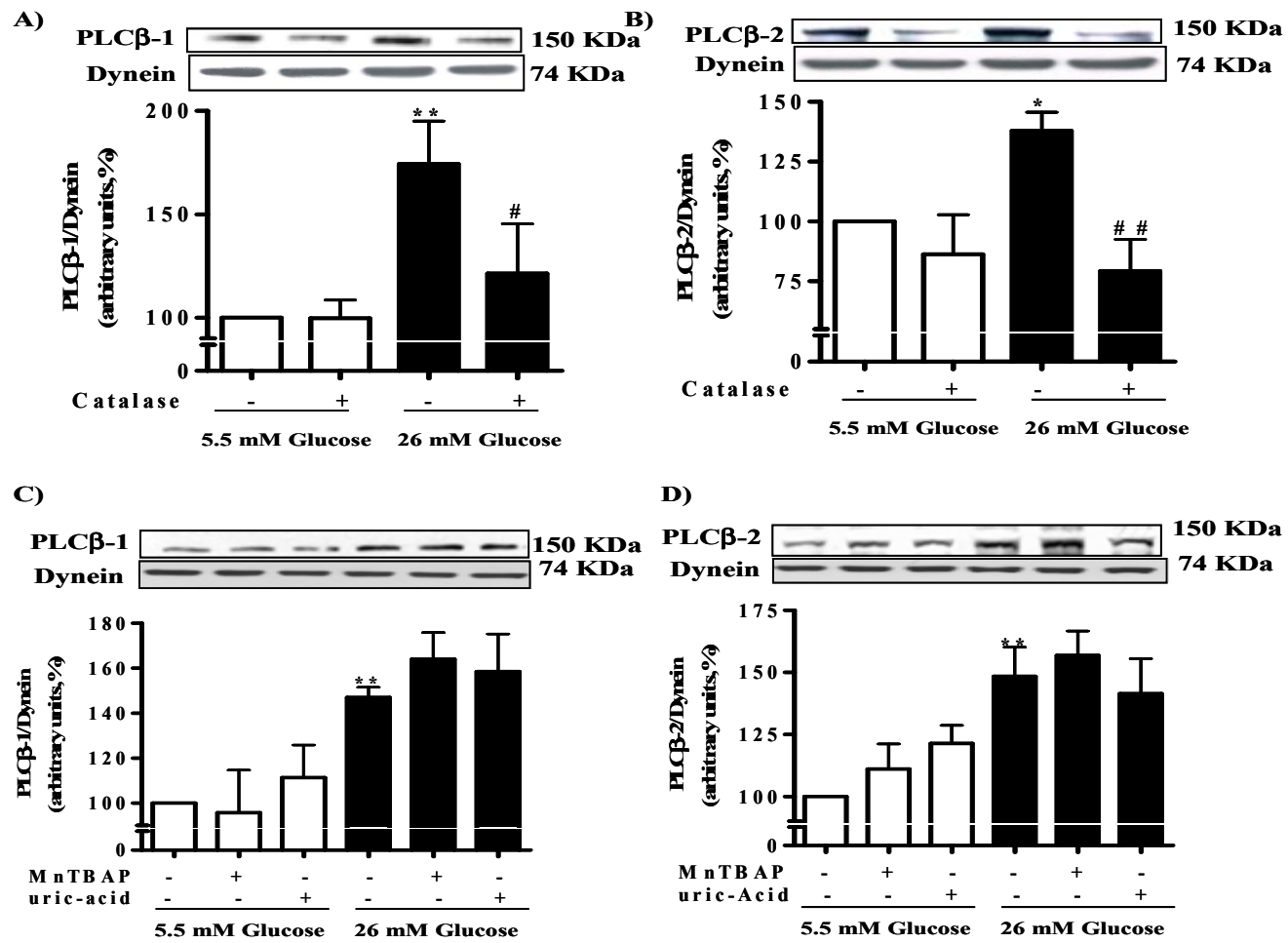
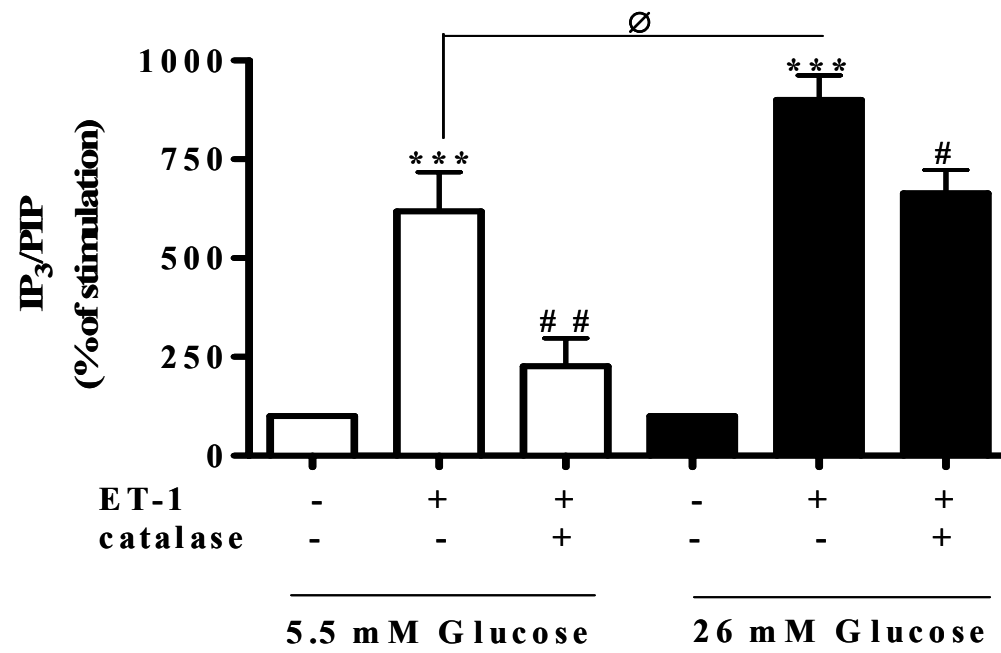


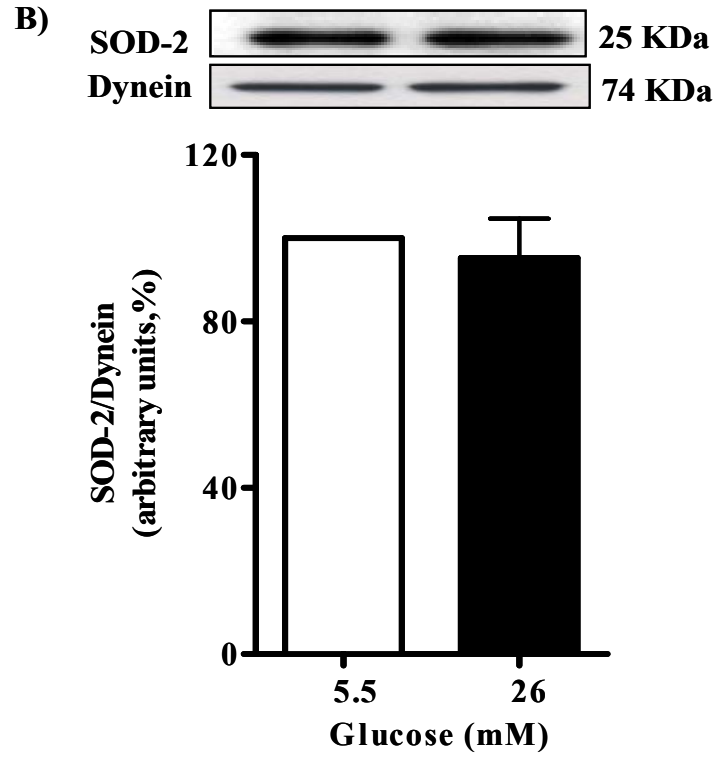
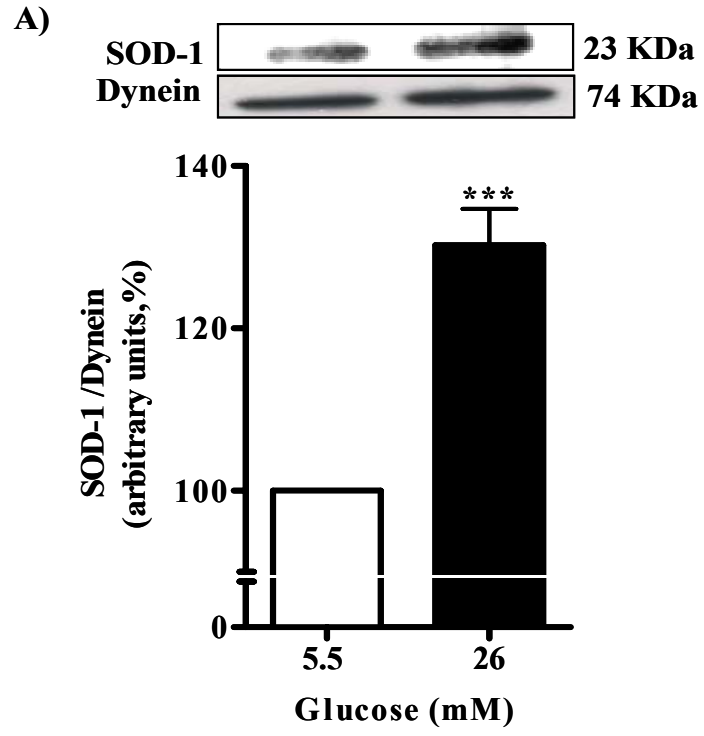
Figure. 3



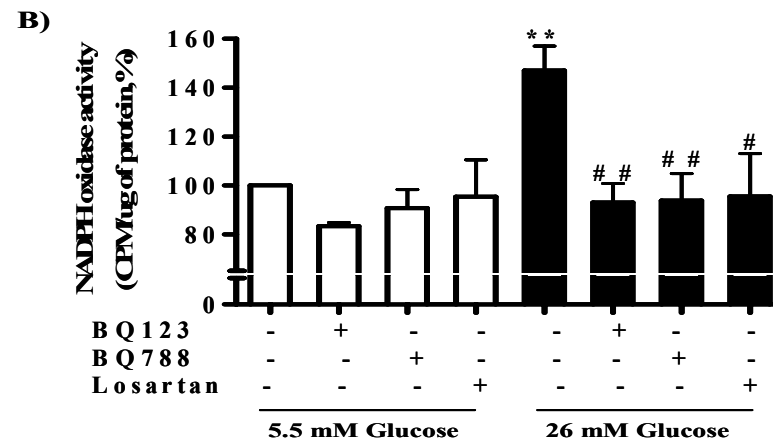
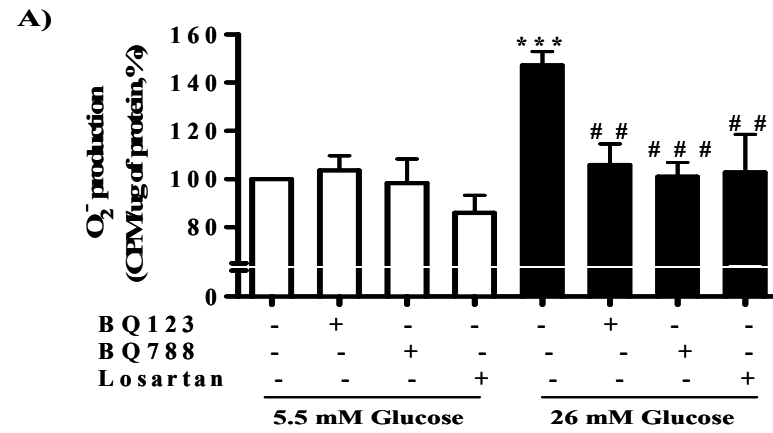
**Figure. 4**



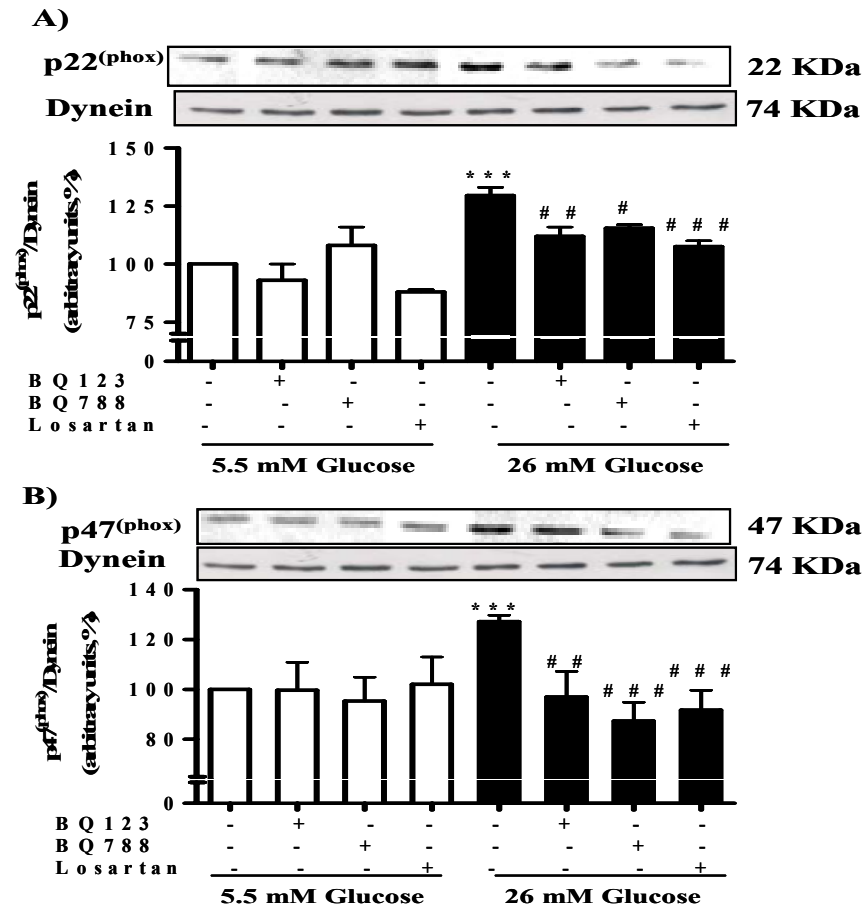
**Figure. 5**



**Figure. 6**



**Figure. 7**



**Figure. 8**

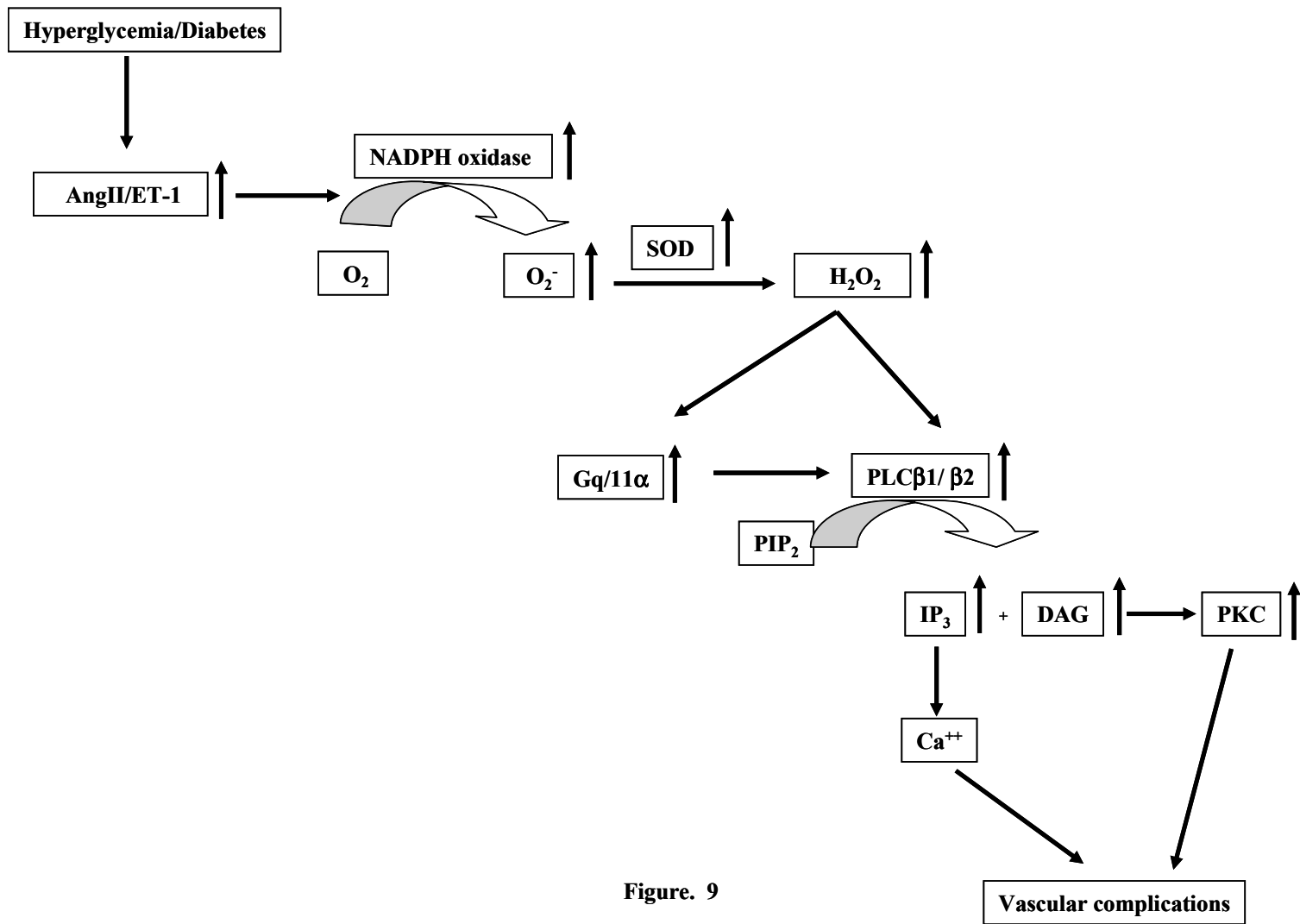


Figure. 9

# **CHAPITRE 5**

**Role of Growth factor receptor transactivation in high glucose-induced  
increased expression of Gq/11 $\alpha$  and associated signaling in vascular  
smooth muscle cells**

**Magda Descorbeth and Madhu B. Anand-Srivastava**

Article en révision dans J. Mol. Cell Cardiol. Janvier 2009



**Role of Growth factor receptor transactivation in high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and associated signaling in vascular smooth muscle cells**

**Running Title:** Growth factor receptor transactivation Gq $\alpha$  signaling in hyperglycemia

Magda Descorbeth and Madhu B. Anand-Srivastava

Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Montreal

Montreal, Quebec, Canada

**Address correspondence and reprint request to:**

Madhu B. Anand-Srivastava, PhD.  
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  
E-mail: madhu.anand-srivastava@umontreal.ca

## **Abstract**

We have recently shown that high glucose increased the expression of Gq/11 $\alpha$ , PLC $\beta$  and mediated signaling in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC). Since high glucose has been shown to increase growth factor receptor activation, we investigated the role of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) transactivation in high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ . Pre-treatment of A10 VSMC with high glucose (26 mM) for 3 days, increased the levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins as determined by Western blotting which were restored to control levels by AG1478, an inhibitor of EGF-R, AG1295, an inhibitor of PDGF-R and PP2, an inhibitor of c-Src. In addition, endothelin-1 (ET-1)-stimulated production of IP<sub>3</sub> that was enhanced by high glucose was also restored towards control levels by AG1478, AG1295 and PP2. High glucose also increased the phosphorylation of EGF-R and PDGF-R which was abolished by AG1478, AG1295 and PP2. Furthermore, high glucose-induced enhanced levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  and PLC $\beta$  were also attenuated by PD98059, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase (MAPK), wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). In addition, AG1478 and AG1295, also attenuated high glucose-induced enhanced phosphorylation of ERK1/2 and AKT. These results suggest that c-Src-induced transactivation of growth factor receptor contributes to the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$ /PLC and -mediated cell signaling through MAPK/PI3K pathway.

**Key words:** High glucose; Gq $\alpha$  protein; PLC $\beta$ ; PI turnover; Growth factor receptor; cSrc; VSMC

## 1. Introduction

Chronic hyperglycemia induces [1] impaired contractility and cell [1] proliferation of vascular smooth muscle cells that play an important role in the development of vascular complications in diabetes [2;3]. Guanine nucleotide regulatory proteins (G-proteins) play a major role in the regulation of vascular tone, and aberration of these mechanisms may contribute to vascular [1] complications in hyperglycemia/diabetes. G-proteins are heterotrimeric proteins and are composed of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. Gq family of G-proteins regulate phosphatidyl inositol (PI) turnover signaling. The activation of Gq $\alpha$  by a G-protein coupled receptor (GPCR) stimulates PLC $\beta$ , which hydrolyzes inositol biphosphates (PIP<sub>2</sub>) to produce the second intracellular messengers; inositol triphosphates (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG) [4;5]. The IP<sub>3</sub> stimulates the release of the calcium (Ca<sup>2+</sup>) from the intracellular stores and DAG activates the protein kinase C (PKC) [6;7].

An enhanced expression and activity of Gq $\alpha$ , PKC and DAG has been reported in different tissues from STZ-induced diabetic rats as well as in Bio-Breeding (BB) rats [8-12]. In addition, high glucose treatment of cultured aortic endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMC) have also been reported to enhance the activity of PKC and DAG [9;13;14]. We have recently shown that the treatment of 10 VSMC with high glucose increased the expression of Gq/11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins resulting in increasing formation of IP<sub>3</sub> by endothelin-1 [15].

Vascular dysfunction including remodelling associated with diabetes, migration and proliferation of VSMC has also been shown to be attributed to the growth factor receptors including epidermal growth factor receptor (EGF-R) and platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) [16-18]. PDGF $\beta$ -receptor has been shown to be upregulated in VSMC from STZ [19] as well as in human aortic VSMC exposed to high glucose [1] and may be responsible for the vascular dysfunction. In addition, high

glucose has also been shown to transactivate EGF-R in aortic VSMC [20] as well as in mesengial cells [21]. However, the implication of growth factor receptor in high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and -mediated signaling has not been examined.

The present study was therefore undertaken to examine if high glucose-induced increased expression of Gq $\alpha$  proteins and -mediated signaling in A10 VSMC is attributed to increased activity of growth factor receptor. Our results demonstrate for the first time that high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and -mediated signaling in A10 VSMC may be attributed to c-Src-induced transactivation of EGF-R and PDGF-R and MAP Kinase (MAPK) and PI3K signaling.

## 2. Materials and methods

PD98059 and wortmannin were purchased from Sigma. The antibodies Gq $\alpha$ (K-17), G11 $\alpha$ (D-17), PLC $\beta$ -1(D-8), PLC $\beta$ -2 (Q-15), p-EGF-R (Tyr 1173), EGF-R (1005), p-PDGF-R (Tyr 857), PDGF-R $\beta$  (958), p-ERK (tyr 204) (E-4), ERK1/2 (C-14), p-AKT1/2/3 (ser473)-R and AKT1/2/3 (H-136) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). AG1478, and AG1295 were purchased from calbiochem. All other chemical were purchased from Sigma chemical Co. (St-Louis, Missouri, USA).

**2.1 Cell Culture and incubation:** A10 VSMC line from embryonic thoracic aorta of rat was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA). The cells were cultured in Dulbeccos's modified Eagle's medium containing normal glucose (5.5 mM), 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic (containing penicillin, streptomycin and amphotrecin B) at 37°C in 95% air and CO<sub>2</sub> as described previously[16-18]. The cells were passaged upon reaching confluence with 0.5% trypsin and used between passages 5 and 20. The confluent VSMCs after 24 hrs of incubation in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, were exposed to normal glucose (5.5 mM) or high glucose (26 mM) for 3 days. For the receptor antagonist studies, cells were incubated in the absence or presence of 5 $\mu$ M of AG1478 or AG1295 for the last 24 hrs of the treatment. After incubation, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 200  $\mu$ l buffer (25 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 25 mmol/l NaCl, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 10 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 2 mol/l benzamidine, 2 mmol/l ethylenebis (oxyethylenenitrolo)-tetraacetic acid, 2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin) on ice. The cell lysates were centrifuged at 12000 $\times$ g for 10 min at 4 °C and the supernatants were used for Western blotting.

**2.2 Western blotting:** Western blotting of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1,  $\beta$ -2 proteins were performed as described previously [22]. After SDS-PAGE, the separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell) with a semidry transblot apparatus (Bio-Rad) at 15 V for 45 min. After transfer, the membranes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated in PBS containing 3% skim milk at room temperature for 2 h. The blots were then incubated with specific antibodies against different proteins, Gq $\alpha$  (K-17) against Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  (D-17) against G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ 1 (D-8) against PLC $\beta$ -1, PLC $\beta$ 2 (Q-15) against PLC $\beta$ -2, PLC $\beta$ 3 (C-20) against PLC $\beta$ -3 in PBS containing 1.5% skim milk and 0.1% Tween-20 at room temperature overnight. The antigen-antibody complexes were detected by incubating the blots with goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) conjugated with horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. The blots were then washed three times with PBS before reaction with enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagents (Amersham). Quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the Enhanced Laser Densitometer, LKB Ultrosan XL, and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Québec, Canada).

### **2.3 Determination of IP<sub>3</sub> Levels**

The IP<sub>3</sub> levels in VSMC were determined as described earlier [23]. The confluent VSMCs were incubated for 24 hrs in a serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium, and were then exposed to high glucose (26mmol/l) or normal glucose (5.5 mmol/l) for three days. 24 hrs before the termination of the treatment, the cells were incubated with 5  $\mu$ Ci/ml [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol (specific activity 25 Ci/mmol) and 10  $\mu$ M DPI. The cells were washed three times with warm (37°C) Earle's balanced salt solution buffer after removing the cultured medium containing un-incorporated isotope. The cells were further incubated for 30 min in the same buffer containing 20 mM lithium chloride to

inhibit the conversion of the inositol phosphates to inositol so that the radiolabeled inositol phosphates could accumulate within the cells. Agonists were added for 2 hrs and the reaction was terminated by adding 0.9 ml of methanol/chloroform/HCl (40:20:1) as described previously [23]. The cells were scraped using a rubber policeman and were then homogenized. Chloroform (0.5 ml) and 0.5 ml distilled water were added to the homogenates, and the samples were then centrifuged to separate lipid and aqueous phases. The aqueous phase was transferred to a column containing 0.8 ml of AG1-X8 resin (200-400 mesh, formate form; obtained from Bio-Rad, Hercules, CA) from which inositol phosphates were eluted sequentially with ammonium formate buffers of increasing molarity [24]. The radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. The lipid phase was counted to measure the phosphatidylinositol pool. The accumulation of inositol phosphate was expressed as the ratio of inositol triphosphate to phosphatidylinositol pool  $\times 10^3$  to correct for the variation in the labelling of the lipid pool.

**2.3 Statistical Analysis:** Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M and were analyzed by ANOVA in conjunction with Bonferroni test where applicable. Comparisons between groups (control and high glucose-treated cells) were made with Student's *t*-test for unpaired samples. Difference between groups was considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1 Effect of growth factor receptor inhibitors on high glucose-evoked enhanced expression of Gq $\alpha$ and G11 $\alpha$ in A10 vascular smooth muscle cells**

We have recently shown that high glucose increased the expression of Gq/11 $\alpha$ , PLC $\beta$  and -mediated signaling in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) [15]. Since high glucose has been shown to transactivate growth factor receptors like EGF-R and PDGF-R [1;19;20], it may be possible that high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC is also attributed to the enhanced activity of EGF-R and PDGF-R. To test this, we examined the effect of growth factor receptor inhibitors on high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC. As reported earlier [15], the levels of Gq $\alpha$  (Fig. 1A,C) and G11 $\alpha$  (Fig. 1B,D) as detected by antibody K-17 and antibody D17 respectively were significantly increased by about 60 % in high glucose-treated cells which were restored to control levels by AG1478, an inhibitor of EGF-R and AG1295, an inhibitor of PDGF-R. However, AG1478 and AG1295 did not have any effect on the levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  in control cells.

#### **3.2 Effect of growth factor receptor inhibitors on high glucose-evoked enhanced expression of PLC $\beta$ 1 and $\beta$ 2 protein in A10 vascular smooth muscle cells**

The effect of AG1478 and AG1295 on high glucose-induced enhanced expression of PLC $\beta$ , a downstream signaling molecule was also examined and the results are shown in Fig. 2. As reported previously [15] the levels of immunodetectable PLC $\beta$ -1 (A,C) and PLC $\beta$ -2 (B,D) as detected by antibody D-8 and antibody Q15 respectively were significantly increased by about 60 % respectively in high glucose-treated cells compared to control cells as determined by densitometric scanning (lower panels). However, the treatment of the cells with AG1478 and AG1295 restored the increased expression of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 proteins to control levels.



### **3.3 Effect of c-Src inhibitor on high glucose-evoked enhanced expression of Gq/G11 $\alpha$ and PLC $\beta$ in A10 vascular smooth muscle cells**

To investigate if c-Src is also implicated in high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC, we examined the effect of PP2, an inhibitor of c-Src, on high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC. The results shown in Fig. 3 indicate that the increased expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  (3A,B) and PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -2 (3C,D) induced by high glucose was restored to control levels by PP2.

### **3.4 Effect of growth factor receptor inhibitors on high glucose-evoked ET-1-induced enhanced formation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells**

Since growth factor receptor inhibitors restored the high glucose-induced increased levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  as well as PLC $\beta$  proteins toward control levels, it was of interest to examine if the increased formation of IP<sub>3</sub> induced by ET-1, as reported earlier [15] was also restored to control levels by growth factor receptor inhibitors. To investigate this, the effect of AG1478 and AG1295 on ET-1-stimulated increased IP<sub>3</sub> levels was examined in A10 cells exposed to high glucose. The results shown in Fig. 4A indicate that the enhanced IP<sub>3</sub> formation by ET-1 in A10 VSMC exposed to high glucose was decreased by AG1478 and AG1295 by about 30 % and 40% respectively. However, AG1478 and AG1295 did not have any effect on the enhanced production of IP<sub>3</sub> evoked by ET-1 in control cells.

### **3.5 Effect of c-Src inhibitor on high glucose-evoked ET-1-induced enhanced formation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells**

Since c-Src inhibitor restored the high glucose-induced increased levels of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  as well as PLC $\beta$  proteins toward control levels, we also examined if this could also result in the restoration of increased formation of IP<sub>3</sub> induced by ET-1. To investigate this, the effect of PP2 on ET-1-stimulated increased IP<sub>3</sub> levels was examined

in A10 cells exposed to high glucose. The results shown in Fig. 4B indicate that the enhanced IP<sub>3</sub> formation by ET-1 in A10 VSMC exposed to high glucose was decreased by PP2 by about 35 % respectively suggesting that ET-1-evoked enhanced production of IP<sub>3</sub> in high glucose-treated cells is also attributed to cSrc. On the other hand, PP2 also attenuated the enhanced production of IP<sub>3</sub> evoked by ET-1 by about 25 % in control cells, suggesting that c-Src is implicated in ET-1-induced IP<sub>3</sub> production.

### **3.6 Effect of c-Src inhibitor on high glucose-induced enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R- $\beta$ in A10 vascular smooth muscle cells**

c-Src has been shown to transactivate growth factor receptor [25;26]. In order to investigate if c-Src is implicated in high glucose-induced transactivation of growth factor receptor, we investigated the effect of PP2 on phosphorylation of EGF-R and PDGF-R. As shown in Fig. 5, high glucose enhanced the phosphorylation of EGF-R and PDGF-R, however, the levels of EGF-R and PDGF-R were not altered. The presence of PP2 as well as AG1478 and AG1295 attenuated the increased phosphorylation of EGF-R and PDGF-R which suggest that high glucose-induced transactivation of growth factor receptor is mediated through c-Src.

### **3.7 Effect of MAPK/AKT inhibitor on high glucose-evoked enhanced expression of Gq/G11 $\alpha$ and PLC $\beta$ in A10 vascular smooth muscle cells**

Since EGF-R and PDGF-R mediate their effects through MAPK/AKT pathways, it was of interest to test if MAPK/AKT are implicated in high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC. To test this, we examined the effect of MAPK and AKT inhibitors, PD98059 and wortmannin (Wn) respectively, on high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC. The results shown in Fig. 6 indicate that the increased expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins in A10 VSMC induced by high glucose was restored to control levels by PD (6A,B) and Wn (6C,D). In addition, the enhanced expressions of PLC $\beta$ -1 and PLC $\beta$ -

2, were also restored to control levels by PD (7A,B) and by Wn (7C,D). These results suggest the implication of MAPK/AKT in high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in VSMC.

### **3.8 Effect of growth factor receptor inhibitors on high glucose-evoked enhanced activation of ERK1/2 and AKT in A10 vascular smooth muscle cells**

To investigate the implication of growth factor receptors in high glucose-induced enhanced activation of ERK1/2 and AKT, the effects of AG1478 and AG1295 on phosphorylation of ERK1/2 and AKT was examined in the presence of high glucose. The results shown in Fig 8 indicate that high glucose exhibited increased levels of p-ERK1/2 (8A) and p-AKT (8B) which were restored to control levels by AG1478 and AG1295.

#### 4. Discussion

We have previously shown that A10 VSMC exposed to high glucose exhibited enhanced levels of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$ , PLC $\beta$ -1 and  $\beta$ 2 compared to control cells [15]. In the present study, we report that high glucose-induced transactivation of growth factor receptors may contribute to the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC.

High glucose-induced enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R has been shown by several investigators [1;19;27;28]. Belmadani et al. showed that endothelial and VSMC from mesenteric resistance artery as well as coronary artery from db/db mice exhibited an enhanced phosphorylation of EGF-R [29]. In addition, an enhanced levels of PDGF-R $\beta$  were shown in aortic VSMC from STZ-diabetic rats compared with normal cells [19]. Furthermore, treatment of cultured human aortic VSMC and monocyte-derived macrophages with high glucose was also shown to enhance the levels of PDGF-R $\beta$  [1;28]. We showed for the first time that A10 VSMC exposed to high glucose exhibited an enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R without altering the levels of EGF-R and PDGF-R. The inhibition of these receptors by AG1478 and AG1295 respectively resulted in the attenuation of high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC. These results suggest that the activation of PDGF-R and EGF-R by high glucose contributes to high glucose-induced enhanced levels of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  protein in A10 VSMC. In this regard, the implication of EGF-R in high glucose-induced expression of collagen I protein has been shown in mesengial cells as well as in glomeruli from STZ-diabetic rats [21]. The fact that the inhibition of EGF-R and PDGF-R also restored the ET-1 induced increased levels of IP<sub>3</sub> to control levels, further suggests a role of EGF-R and PDGF-R in high glucose-induced enhanced PLC signaling activated by ET-1.

A role of MAPK and PI3K in protein synthesis has been well established [30-33]. We have recently reported the implication of MAPK and PI3K in Ang II-induced enhanced expression of G $\alpha$  protein in A10 VSMC [34]. In the present study, we report that high glucose-induced increased expression of Gq $\alpha$ /PLC $\beta$  proteins is attributed to the activation of MAPK and PI3K pathway, because PD98059, a MAPK inhibitor and wortmannin, an AKT inhibitor, attenuated the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  protein in A10 VSMC. Our results are in accordance with the studies of other investigators who reported high glucose-induced increased phosphorylation of ERK1/2 and AKT in human VSMC [27] and in VSMC from mesenteric resistance arteries [35]. Furthermore, high glucose-induced impaired regulation of AKT and MAPK has been reported to contribute to vascular dysfunctions [27;35]. Campbell et al. [27] have also shown that high glucose-induced increased AKT and ERK1/2 activity was associated with VSMC chemotaxis. In addition, high glucose-induced phosphorylation of ERK1/2 was also shown to result in increased deposition of collagen in mesenteric resistance arteries [35]. Taken together it can be suggested that high glucose-induced enhanced phosphorylation of ERK1/2 and AKT that increases the expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  and thereby enhances the production of IP $_3$ , and intracellular levels of Ca $^{2+}$  may contribute to the vascular complications observed in diabetes.

The precise mechanism by which high glucose increased AKT and MAPK activity is not yet well known. However, several studies have shown the implication of growth factor receptors in the activation of MAPK and PI3-K/AKT pathways [36-38]. Zhang et al. have shown that PDGF-induced cardiac fibroblast and aortic VSMC proliferation was mediated through the activation of ERK1/2 and AKT pathway [39;40]. However, we showed that high glucose-induced enhanced phosphorylation of AKT and ERK1/2 was restored to control levels by growth factor receptor inhibitors,

AG1478 and AG1295, and suggest the implication of EGF-R and PDGF-R transactivation in high glucose-induced increased phosphorylation of AKT and ERK1/2. Taken together, it can be suggested that high glucose-induced transactivation of EGF-R and PDGF-R through the activation of AKT and ERK1/2 pathways may be responsible for high glucose-induced increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 VSMC.

We also examined the intracellular signaling mechanisms that lead to the transactivation of EGF-R and PDGF-R by high glucose. We showed that PP2, c-Src inhibitor, attenuated high glucose-induced activation of EGF-R and PDGF-R as well as the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins. These results suggest that c-Src may be an upstream signaling molecule in high glucose-induced EGF-R and PDGF-R transactivation that contributes to the enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins. Furthermore, the fact that PP2 also attenuated the high glucose-induced, ET-1-evoked increased levels of IP<sub>3</sub> further suggests a role of c-Src in ET-1-induced enhanced PLC signaling under hyperglycaemic conditions. In this regard, a role of Src kinases in the transactivation of EGF-R and PDGF-R has been reported [25;26]. Suzaki et al.[41] have shown that rat mesangial cells exposed to high glucose, exhibited an increased activity of c-Src that is associated with the increased activity of ERK5 [41].

The mechanism by which high glucose transactivates c-Src and thereby EGF-R and PDGF-R is not clear. A role of Ang II in the increased expression of growth factor and the transactivation of growth factor receptors through c-Src has been well documented [26;42]. We have recently shown the implication of Ang II in high glucose-induced increased expression of Gq $\alpha$ /PLC and signaling in A10 VSMC [15]. Taken together it may be possible that the high glucose-induced increased levels of Ang II may contribute to the transactivation of growth factor receptors and thereby increased expression of Gq $\alpha$ /PLC $\beta$  proteins. Furthermore, the contribution of increased oxidative

stress-induced by high glucose through Ang II in the transactivation of c-Src and growth factor receptors can not be ruled out. This notion is supported by our preliminary results showing that catalase, a scavenger of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, restored the high glucose-induced enhanced phosphorylation of EGF-R and PDGF-R (unpublished observation), further supports the implication of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high glucose-induced transactivation of EGF-R and PDGF-R

In conclusion, we provided the first evidence that high glucose transactivates EGF-R and PDGF-R through c-Src, which by activating MAPK and PI3K signaling may be responsible for the high glucose-induced enhanced expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$ . The increased expression of Gq/11 $\alpha$  and PLC $\beta$  results in enhanced production of IP<sub>3</sub>, which by increasing the intracellular levels of Ca<sup>2+</sup> may contribute to the vascular complications observed in diabetes (Fig. 9). From these studies, it may be suggested that the inhibition of c-Src and EGF-R and PDGF-R that may improve impaired Gq $\alpha$ /PLC signaling, and thereby intracellular Ca<sup>2+</sup> levels may be used as potential therapeutic agents for the treatment of vascular complications of diabetes.

## **GRANT**

This study was supported by a grant from Canadian Institutes of Health Research [MOP 53074].

**Abbreviations:** IP<sub>3</sub>, inositol triphosphates; PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; EGF-R, epidermal growth factor receptor, PDGF-R, platelet derived growth factor receptor.



## References

- [1] Akiyama N, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Hamada Y, Nakashima E, Matsubara T, Oiso Y, and Nakamura J. High glucose-induced upregulation of Rho/Rho-kinase via platelet-derived growth factor receptor-beta increases migration of aortic smooth muscle cells. *J.Mol.Cell Cardiol.* 45: 326-332, 2008.
- [2] Giugliano D, Ceriello A, and Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-267, 1996.
- [3] Koya D and King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47: 859-866, 1998.
- [4] Berridge MJ. Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 494: 39-51, 1987.
- [5] Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, and Sternweis PC. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807, 1991.
- [6] Brass LF, Shaller CC, and Belmonte EJ. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J.Clin.Invest* 79: 1269-1275, 1987.
- [7] Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, and Spiegel AM. The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *J.Biol.Chem.* 266: 9309-9313, 1991.
- [8] Goraya TY, Wilkins P, Douglas JG, Zhou J, and Berti-Mattera LN. Signal transduction alterations in peripheral nerves from streptozotocin-induced diabetic rats. *J.Neurosci.Res.* 41: 518-525, 1995.
- [9] Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, and King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89: 11059-11063, 1992.
- [10] Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, and King GL. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am.J.Physiol* 265: E783-E793, 1993.
- [11] Tappia PS, Asemu G, Aroutiounova N, and Dhalla NS. Defective sarcolemmal phospholipase C signaling in diabetic cardiomyopathy. *Mol.Cell Biochem.* 261: 193-199, 2004.
- [12] Yang JM, Cho CH, Kong KA, Jang IS, Kim HW, and Juhn YS. Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp.Mol.Med.* 31: 179-184, 1999.

- [13] Ramana KV, Friedrich B, Tammali R, West MB, Bhatnagar A, and Srivastava SK. Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 54: 818-829, 2005.
- [14] Williams B, Gallacher B, Patel H, and Orme C. Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46: 1497-1503, 1997.
- [15] Descorbeth M and Anand-Srivastava MB. High glucose increases the expression of Gq/11{alpha} and PLC-{beta} proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 295: H2135-H2142, 2008.
- [16] Campbell M, Allen WE, Silversides JA, and Trimble ER. Glucose-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor-beta receptor potentiates vascular smooth muscle cell chemotaxis. *Diabetes* 52: 519-526, 2003.
- [17] Kawano M, Koshikawa T, Kanzaki T, Morisaki N, Saito Y, and Yoshida S. Diabetes mellitus induces accelerated growth of aortic smooth muscle cells: association with overexpression of PDGF beta-receptors. *Eur.J.Clin.Invest* 23: 84-90, 1993.
- [18] Nakamura J, Kasuya Y, Hamada Y, Nakashima E, Naruse K, Yasuda Y, Kato K, and Hotta N. Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity. *Diabetologia* 44: 480-487, 2001.
- [19] Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, Sugae N, Tsuchiya H, Jimbu Y, Tominaga M, and Kato T. Altered PDGF-BB-induced p38 MAP kinase activation in diabetic vascular smooth muscle cells: roles of protein kinase C-delta. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24: 2095-2101, 2004.
- [20] Konishi A and Berk BC. Epidermal growth factor receptor transactivation is regulated by glucose in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 278: 35049-35056, 2003.
- [21] Wu D, Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Gao B, and Krepinsky JC. Collagen I induction by high glucose levels is mediated by epidermal growth factor receptor and phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in mesangial cells. *Diabetologia* 50: 2008-2018, 2007.
- [22] Anand-Srivastava MB, de CJ, and Thibault C. DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am.J.Hypertens.* 6: 72-75, 1993.
- [23] Mouawad R, Li Y, and Anand-Srivastava MB. Atrial natriuretic peptide-C receptor-induced attenuation of adenylyl cyclase signaling activates phosphatidylinositol turnover in A10 vascular smooth muscle cells. *Mol.Pharmacol.* 65: 917-924, 2004.
- [24] Dean NM and Beaven MA. Methods for the analysis of inositol phosphates. *Anal.Biochem.* 183: 199-209, 1989.

- [25] Saito S, Frank GD, Mifune M, Ohba M, Utsunomiya H, Motley ED, Inagami T, and Eguchi S. Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src. *J.Biol.Chem.* 277: 44695-44700, 2002.
- [26] Ushio-Fukai M, Griending KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, and Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21: 489-495, 2001.
- [27] Campbell M, Allen WE, Sawyer C, Vanhaesebroeck B, and Trimble ER. Glucose-potentiated chemotaxis in human vascular smooth muscle is dependent on cross-talk between the PI3K and MAPK signaling pathways. *Circ.Res.* 95: 380-388, 2004.
- [28] Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y, and Yamada N. Enhanced expression of platelet-derived growth factor-beta receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 45: 507-512, 1996.
- [29] Belmadani S, Palen DI, Gonzalez-Villalobos RA, Boulares HA, and Matrougui K. Elevated epidermal growth factor receptor phosphorylation induces resistance artery dysfunction in diabetic db/db mice. *Diabetes* 57: 1629-1637, 2008.
- [30] Wang Y, Yan T, Wang Q, Wang W, Xu J, Wu X, and Ji H. PKC-dependent extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in the inhibition of I $\beta$  on AngiotensinII-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 375: 151-155, 2008.
- [31] Kim TJ, Lee JH, Lee JJ, Yu JY, Hwang BY, Ye SK, Shujuan L, Gao L, Pyo MY, and Yun YP. Corynoxene isolated from the hook of *Uncaria rhynchophylla* inhibits rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation through the blocking of extracellular signal regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Biol.Pharm.Bull.* 31: 2073-2078, 2008.
- [32] Radhakrishnan Y, Maile LA, Ling Y, Graves LM, and Clemmons DR. Insulin-like growth factor-I stimulates Shc-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation via Grb2-associated p85 in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 283: 16320-16331, 2008.
- [33] Hashim S, Li Y, and Anand-Srivastava MB. Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through G $\alpha$  protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 291: H3144-H3153, 2006.
- [34] Ge C and Anand-Srivastava MB. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in AII-mediated enhanced expression of G $\alpha$  proteins in vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 251: 570-575, 1998.
- [35] Belmadani S, Zerfaoui M, Boulares HA, Palen DI, and Matrougui K. Microvessel vascular smooth muscle cells contribute to collagen type I deposition through ERK1/2 MAP kinase,  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin, and TGF- $\beta$ 1

in response to ANG II and high glucose. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 295: H69-H76, 2008.

- [36] Kim J, Lee CK, Park HJ, Kim HJ, So HH, Lee KS, Lee HM, Roh HY, Choi WS, Park TK, and Kim B, Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *J.Pharmacol.Sci.* 101: 135-143, 2006.
- [37] Lee CK, Lee HM, Kim HJ, Park HJ, Won KJ, Roh HY, Choi WS, Jeon BH, Park TK, and Kim B, Syk contributes to PDGF-BB-mediated migration of rat aortic smooth muscle cells via MAPK pathways. *Cardiovasc.Res.* 74: 159-168, 2007.
- [38] Son DJ, Kang J, Kim TJ, Song HS, Sung KJ, Yun dY, and Hong JT. Melittin, a major bioactive component of bee venom toxin, inhibits PDGF receptor beta-tyrosine phosphorylation and downstream intracellular signal transduction in rat aortic vascular smooth muscle cells. *J.Toxicol.Enviroin.Health A* 70: 1350-1355, 2007.
- [39] Zhang LJ, Ma WD, Yang Y, Wang RM, Chen P, Yan JB, Li Q, Li DD, and Yang F. [AcSDKP attenuates PDGF-induced cardiac fibroblasts proliferation and collagen expression: role of extracellular regulated protein kinase 1/2 pathway]. *Zhonghua Xin.Xue.Guan.Bing.Za Zhi.* 36: 444-448, 2008.
- [40] Kim TJ and Yun YP. Antiproliferative activity of NQ304, a synthetic 1,4-naphthoquinone, is mediated via the suppressions of the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cells. *Vascul.Pharmacol.* 46: 43-51, 2007.
- [41] Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Nishiyama A, Ozawa Y, Kyaw M, Izawa Y, Kanematsu Y, Tsuchiya K, and Tamaki T. BMK1 is activated in glomeruli of diabetic rats and in mesangial cells by high glucose conditions. *Kidney Int.* 65: 1749-1760, 2004.
- [42] Montezano AC, Callera GE, Yogi A, He Y, Tostes RC, He G, Schiffrin EL, and Touyz RM. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 28: 1511-1518, 2008.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1 Effect of Growth factor receptor inhibitors on the expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. AG1478 (5  $\mu$ M) or AG1295 (5 $\mu$ M) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq $\alpha$  (A, C, upper panels) and G11 $\alpha$  (B, D, upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01 vs control, # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 vs 26 mM Glucose.

**Fig.2 Effect of Growth factor receptor inhibitors on the expression of PLC $\beta$ 1/2 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. AG1478 (5  $\mu$ M) or AG1295 (5 $\mu$ M) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PLC $\beta$ -1 (A,C, upper panels) and PLC $\beta$ -2 (B,D, upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001 vs control, # P<0.05 vs 26 mM of Glucose.

**Fig. 3 Effect of c-Src inhibitor (PP2) on the expression of Gq $\alpha$ , G11 $\alpha$  and PLC $\beta$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 73 hrs at 37°C. PP2 (10  $\mu$ M) was added after 48 hrs of glucose

treatment. Membranes were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq $\alpha$  (A), G11 $\alpha$  (B), PLC $\beta$ -1 (C) and PLC $\beta$ -2 (D) (upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as a percentage of control taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 vs control. # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01, and ### $P$ <0.001 vs 26 mM of glucose.

**Fig.4 Effect of growth factor receptors and c-Src inhibitors on ET-1-induced augmentation of IP<sub>3</sub> in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. A10 VSMCs were incubated in the presence of [*myo*-2-<sup>3</sup>H]inositol alone or in combination with AG1478 (5  $\mu$ M), AG1295 (5  $\mu$ M) (A) and PP2 (10  $\mu$ M) (B) after 48 hrs of glucose treatment. IP<sub>3</sub> formation was determined as described in *Materials and Methods*. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\*\* $P$ <0.001 vs controls, #  $P$ <0.05, ##  $P$ <0.01 vs ET-1,  $\delta$   $P$ <0.05,  $\delta\delta$   $P$ <0.01.

**Fig.5 Effect of Growth factor receptors and c-Src inhibitors on the phosphorylation of EGF-R and PDGF-R in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. AG1478 (5  $\mu$ M), AG1295 (5 $\mu$ M) or PP2 (10  $\mu$ M) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against p-EGF-R (A,C, upper panels) and p-PDGF-R (B,D, upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\* $P$ <0.01, \* \*\* $P$ <0.001 vs control, ##  $P$ <0.01, ###  $P$ <0.001 vs 26 mM Glucose.

**Fig.6 Effect of PD 98059 and wortmannin on the expression of Gq $\alpha$  and G11 $\alpha$  proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. PD 98059 (10  $\mu$ M) or wortmannin (100 nM) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against Gq $\alpha$  (A, C, upper panels) and G11 $\alpha$  (B, D, upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*\*\*P<0.001, vs control, # # P<0.01, # # # P<0.001 vs 26 mM Glucose.

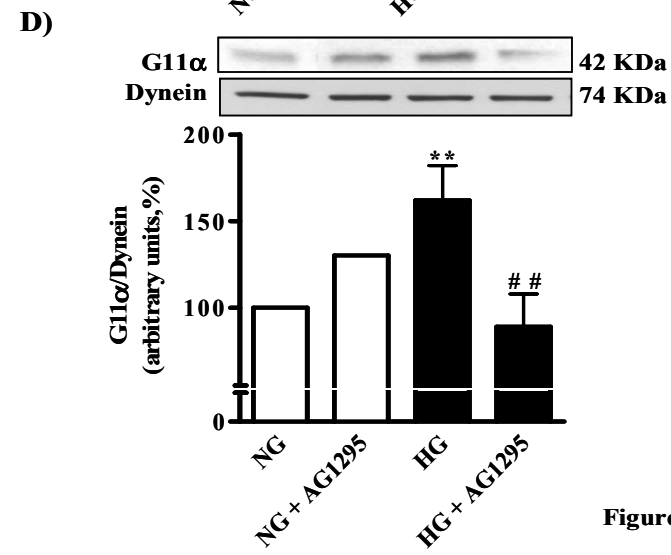
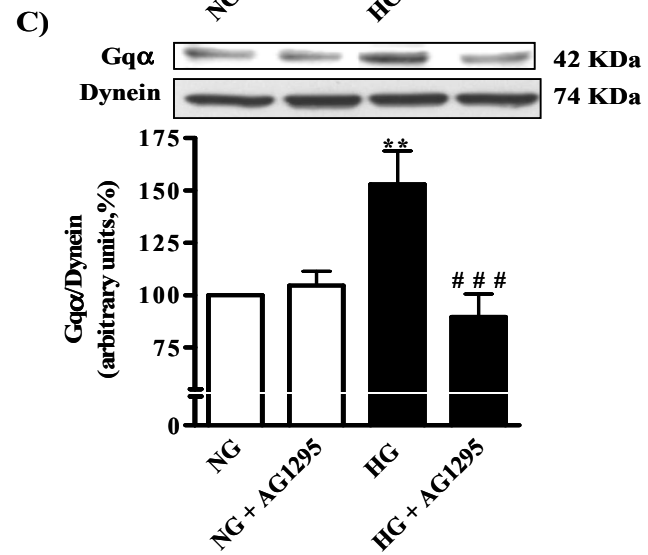
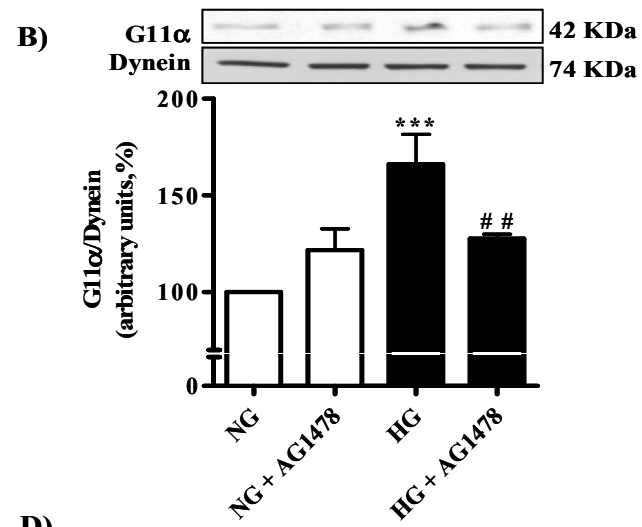
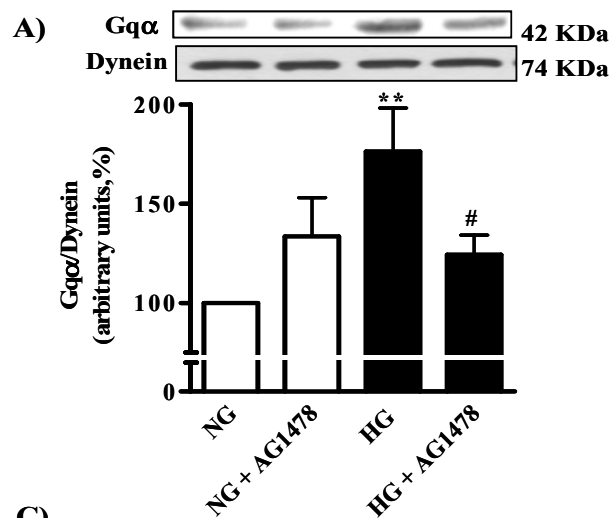
**Fig.7 Effect of PD 98059 and wortmannin on the expression of PLC $\beta$ 1/2 proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. PD 98059 (10  $\mu$ M) or wortmannin (100 nM) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against PLC $\beta$ -1 (A,C, upper panels) and PLC $\beta$ -2 (B,D, upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs control, # P<0.05, # # P<0.01 vs 26 mM of Glucose.

**Fig.8 Effect of Growth factor receptor inhibitors on the phosphorylation of ERK1/2 and AKT proteins in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to high glucose.** A10 VSMC were incubated in the presence of 5.5 mM (control, NG) or 26 mM glucose (high glucose, HG) for 72 hrs at 37°C. AG1478 (5  $\mu$ M) or AG1295

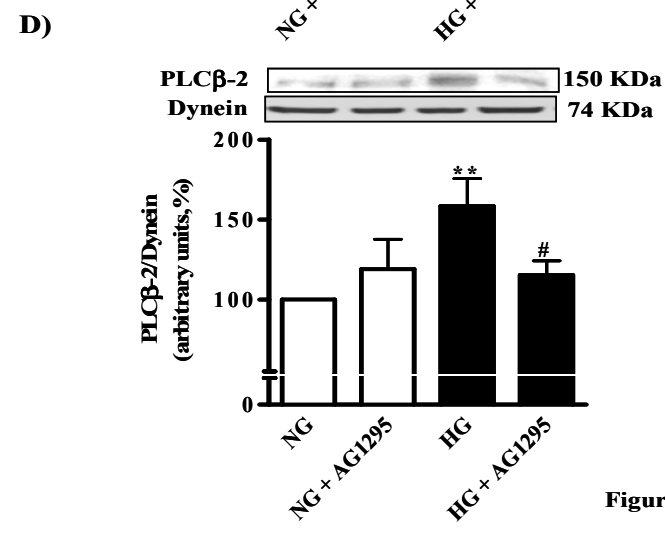
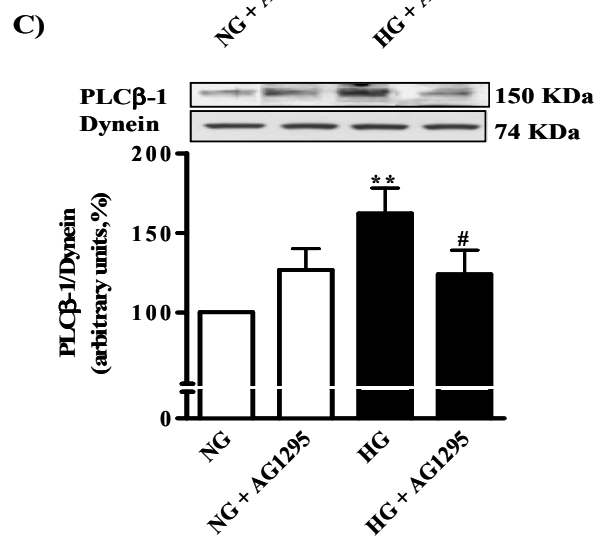
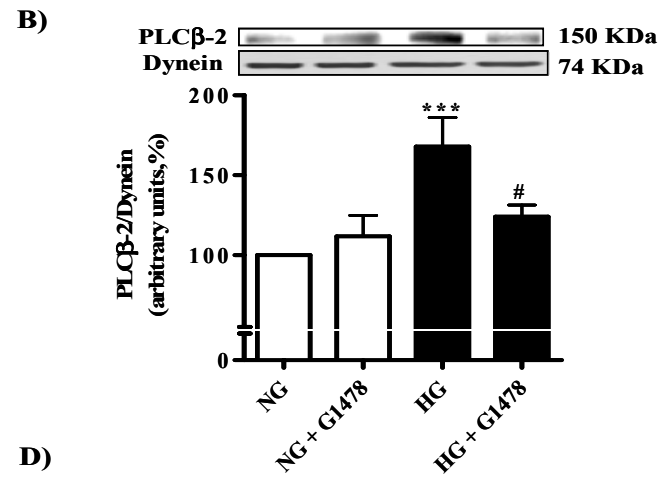
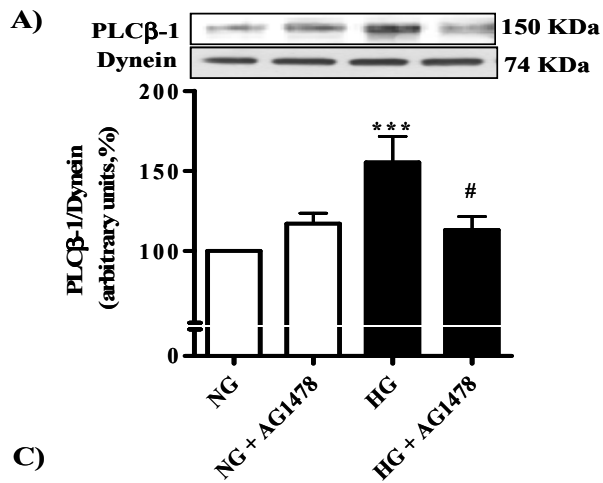
(5 $\mu$ M) were added after 48 hrs of glucose treatment. The cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies against p-ERK1/2 (A, upper panels) and p-AKT (B, upper panels) as described in *Materials and Methods*. The proteins were quantified by densitometric scanning (lower panels). The results are expressed as percentage of control, taken as 100%. Values are means  $\pm$  SEM of three separate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control, # P<0.05, ## P<0.01 vs 26 mM Glucose.

**Fig. 9 Schematic diagram summarizing the possible mechanisms by which hyperglycemia/diabetes increases the expression of Gq/11 $\alpha$  and-mediated cell signaling.**

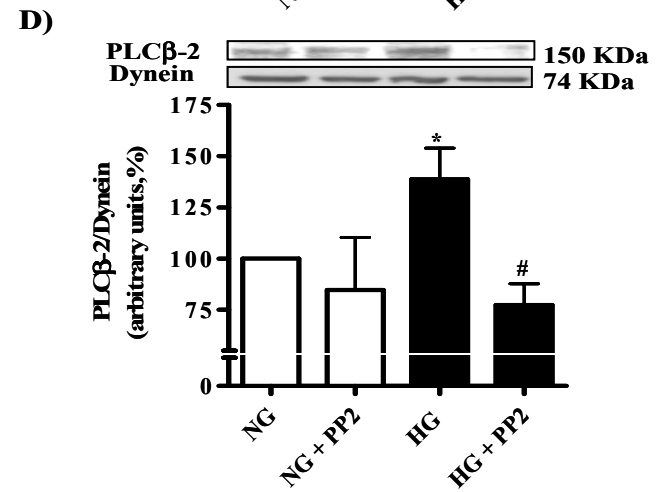
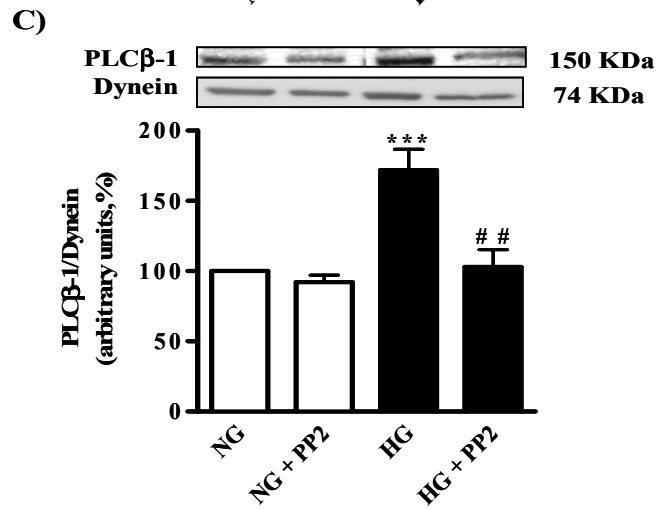
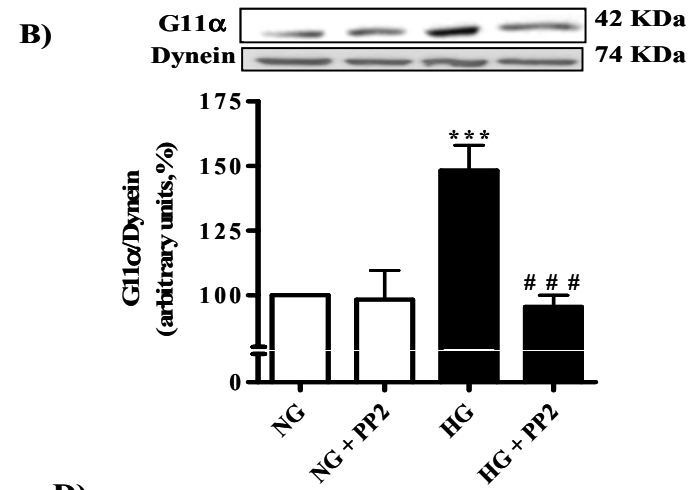
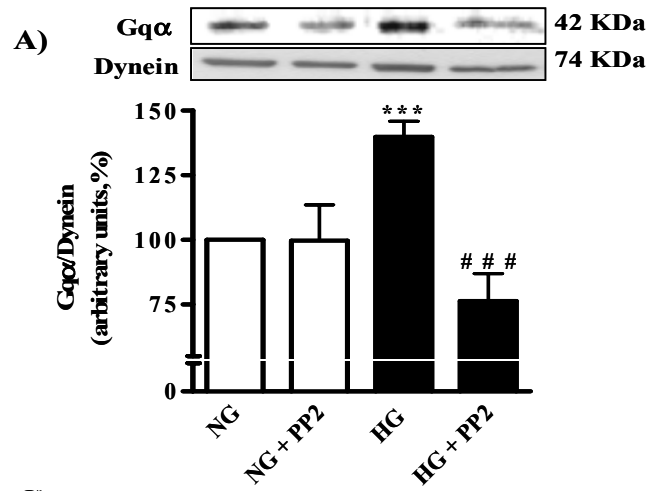




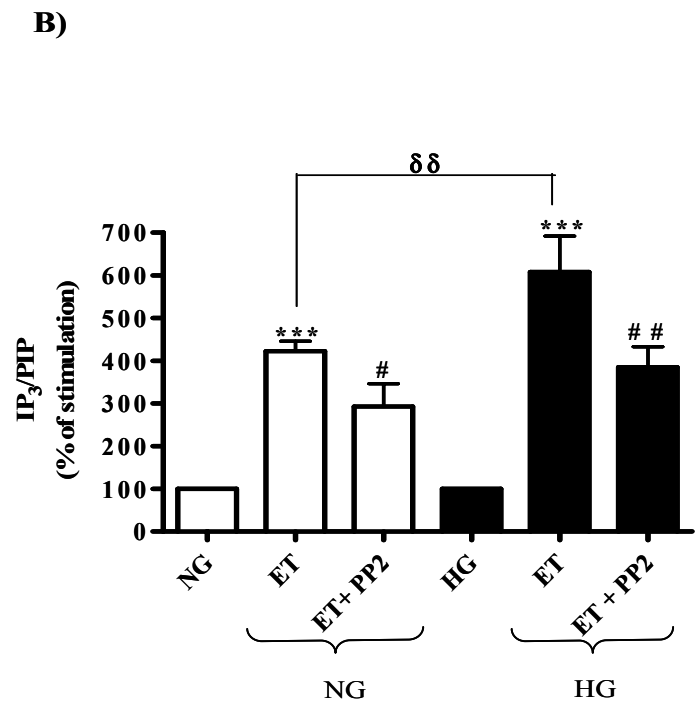
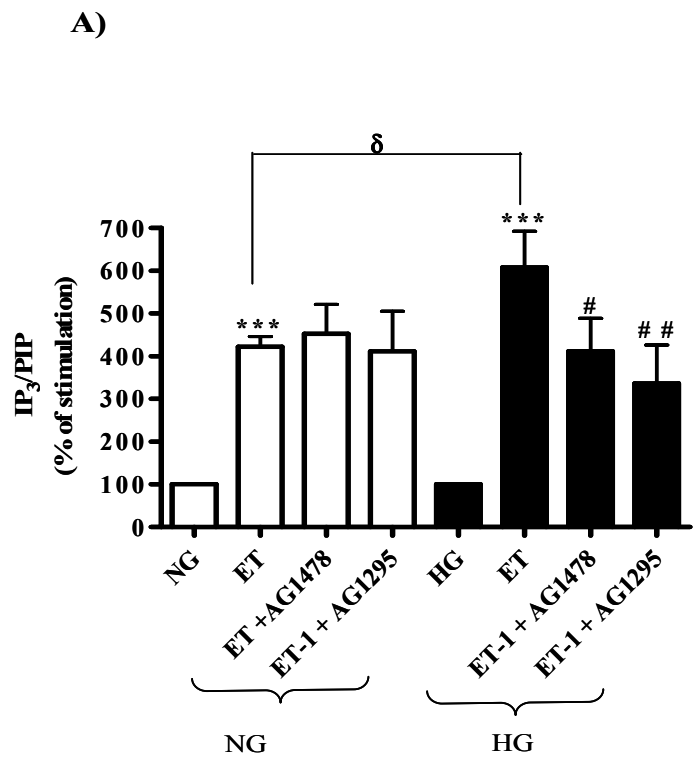
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

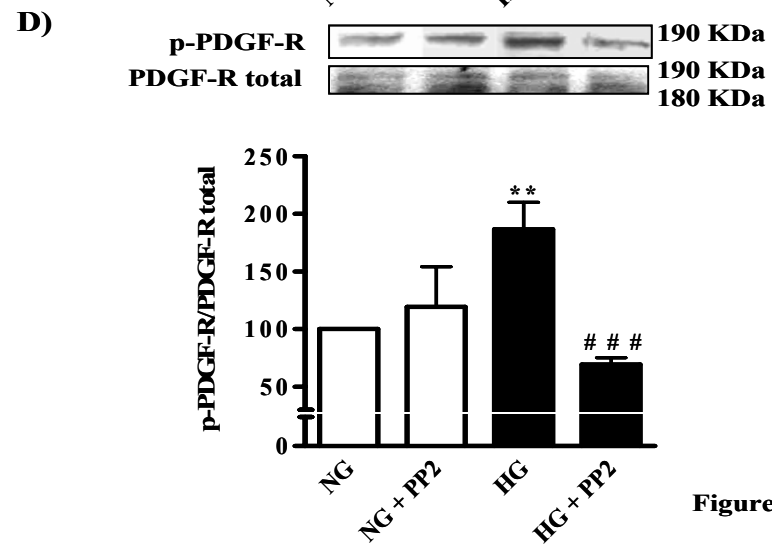
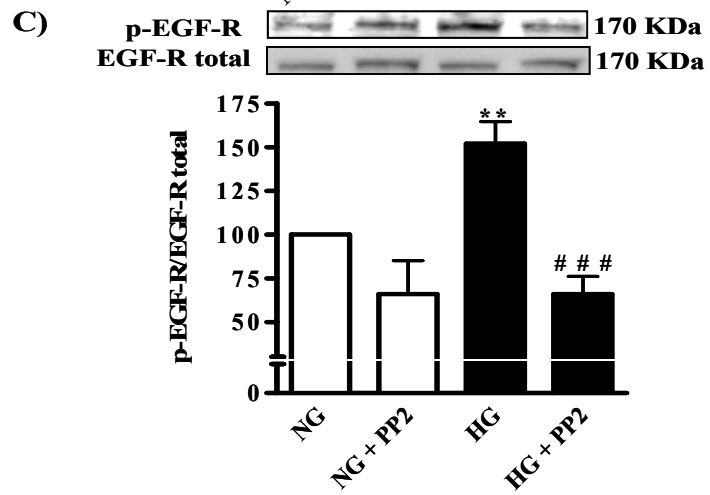
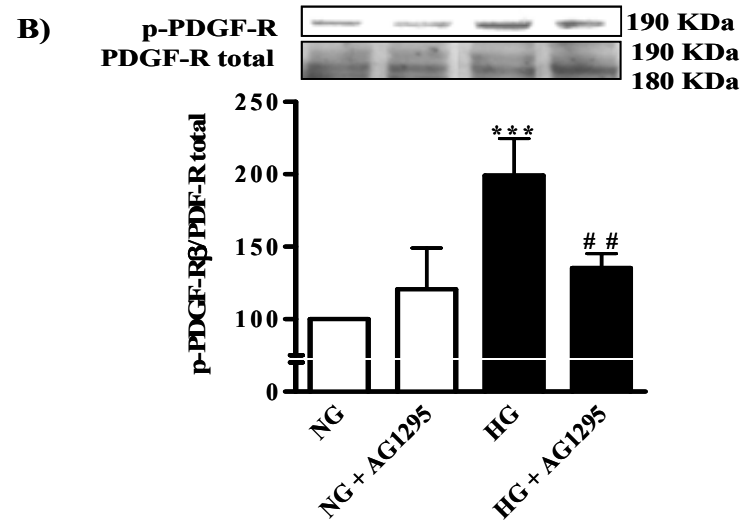
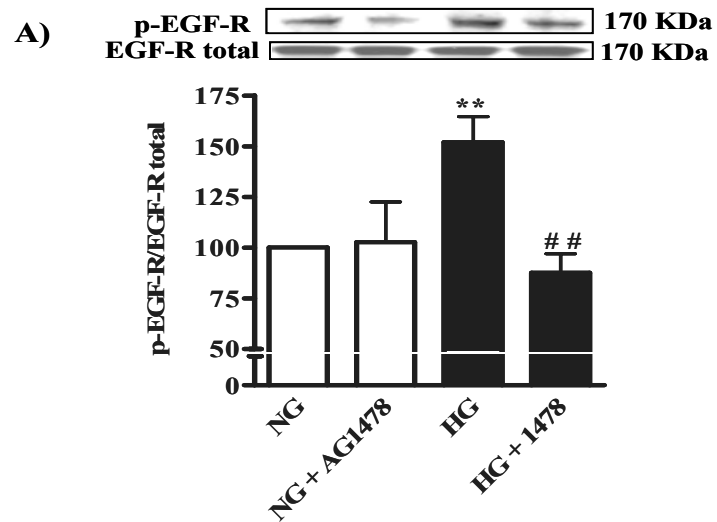
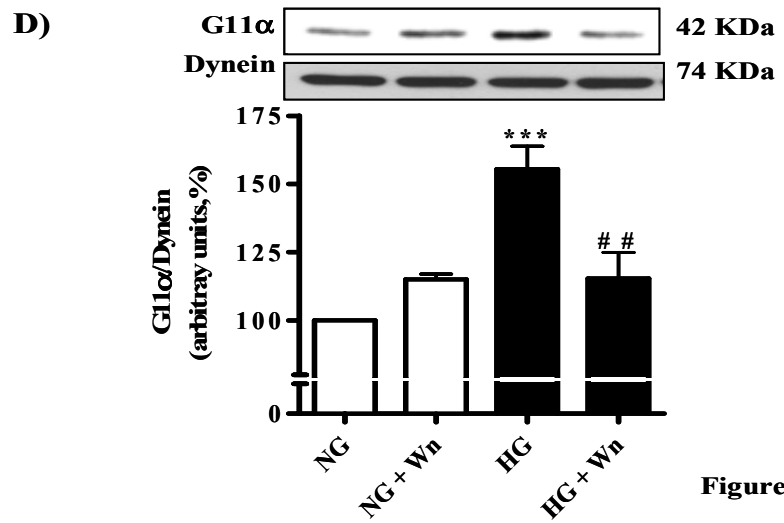
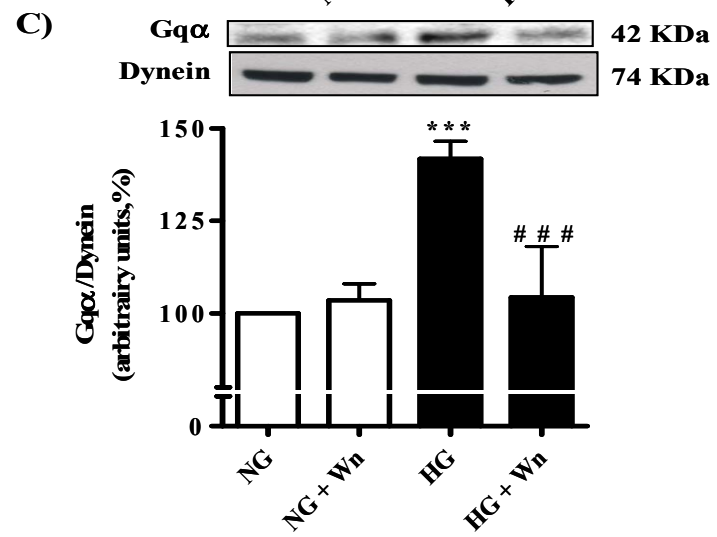
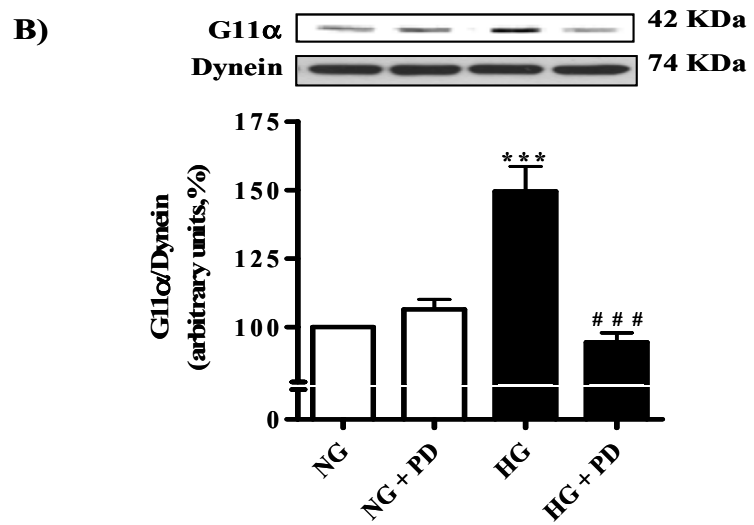
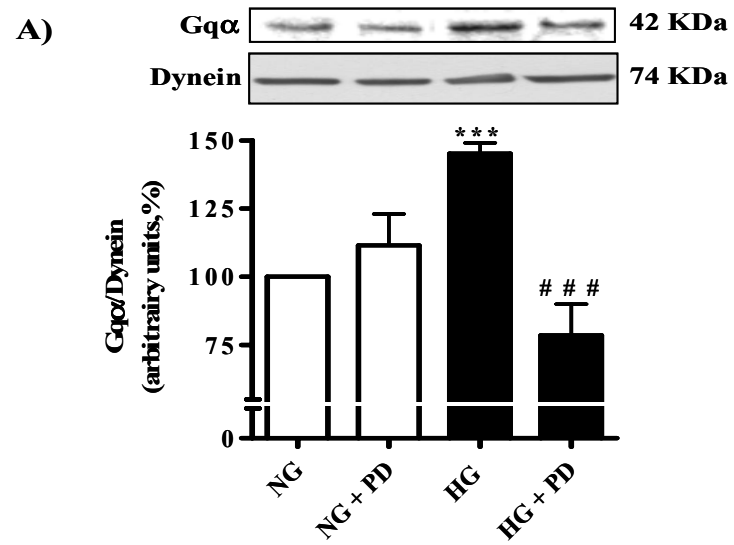
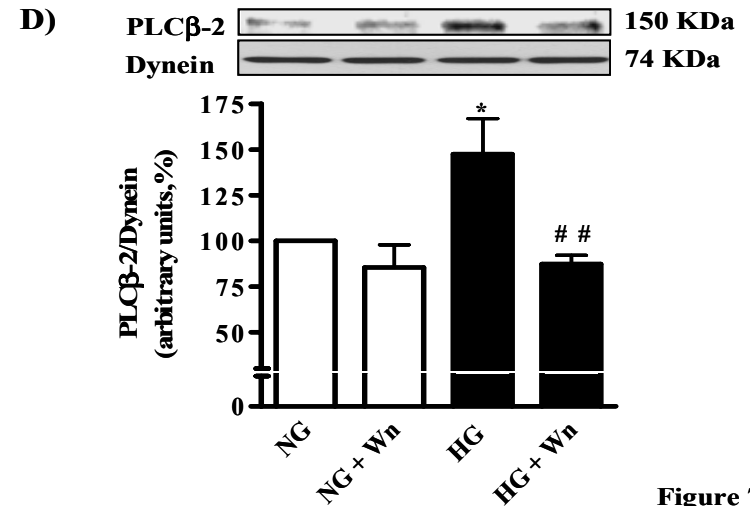
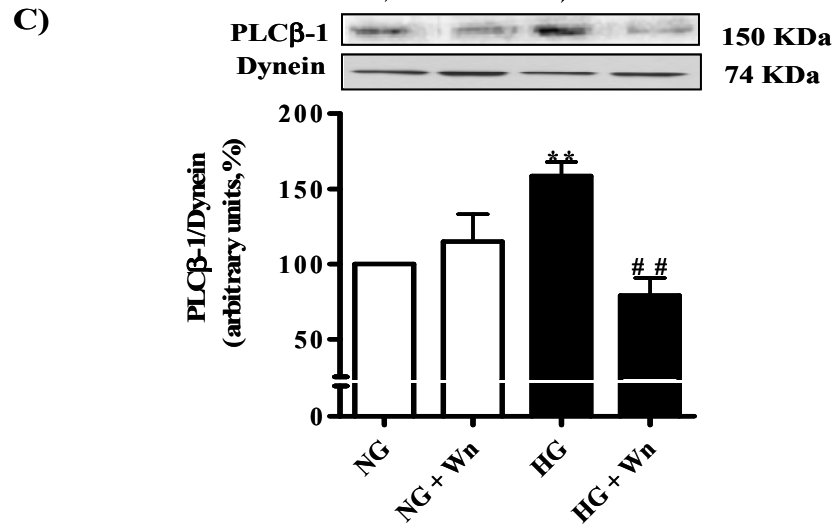
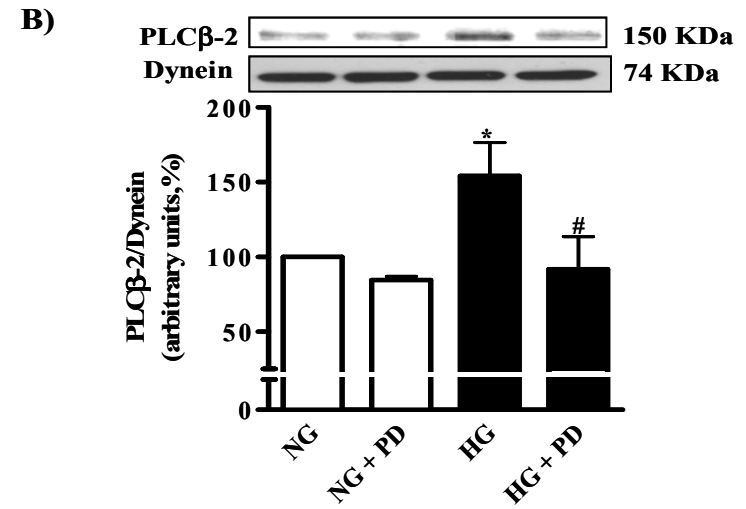
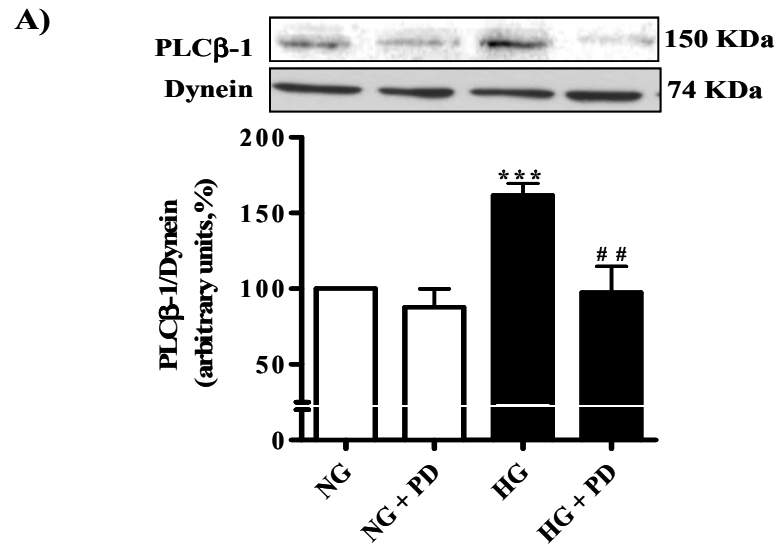


Figure 5



**Figure 6**



**Figure 7**

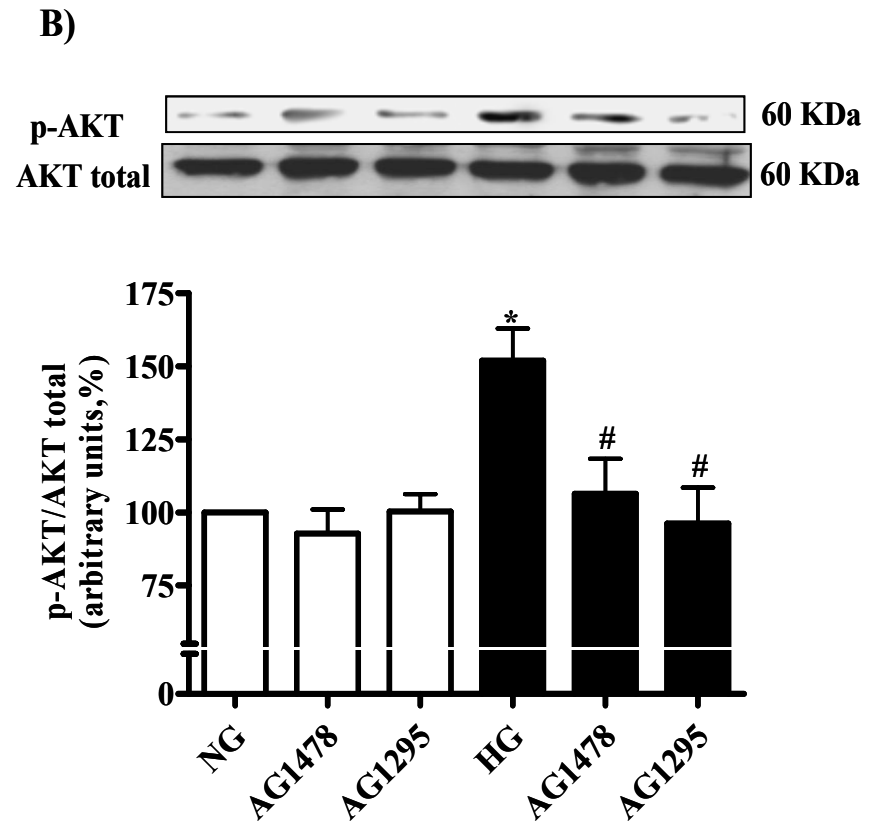
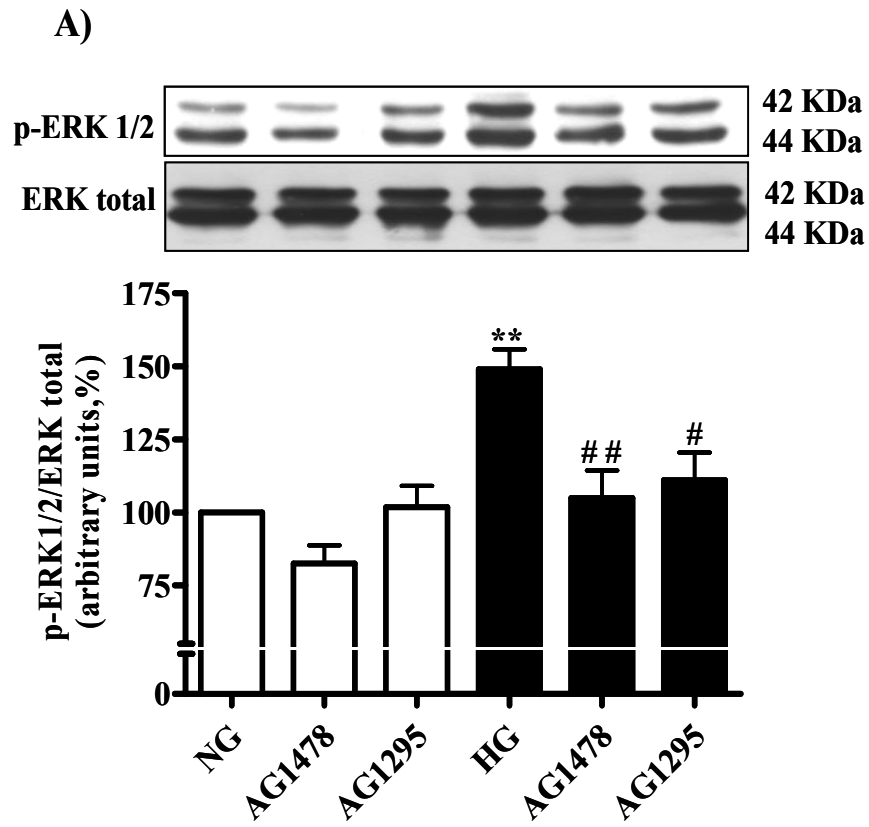
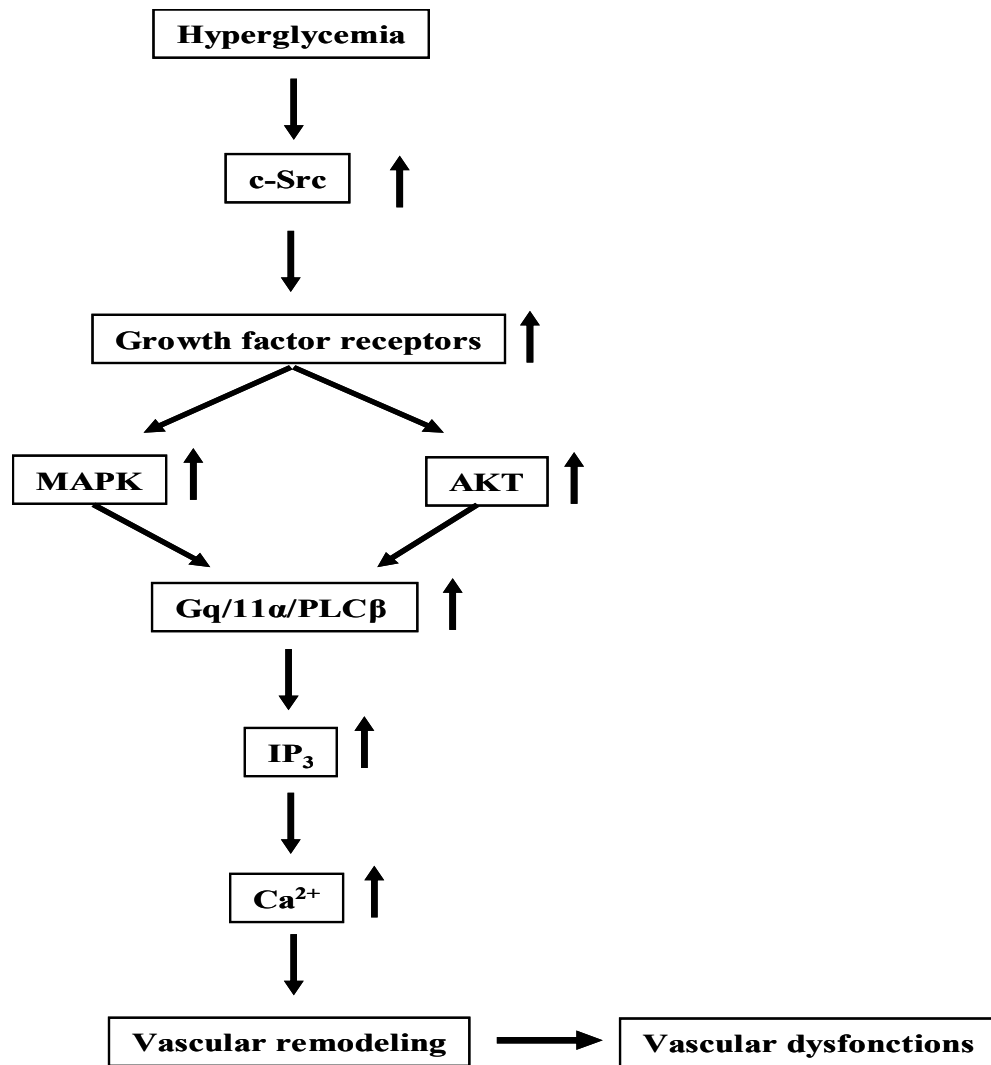


Figure 8





**Figure 9**

# **CHAPITRE 6**

## **DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE**

## Discussion générale

Les complications vasculaires, telles qu'une augmentation de la contractilité et de la prolifération des CMLV, sont des complications communes qu'on retrouve au niveau du diabète (Giugliano *et al.*, 1996; Koya and King, 1998). L'hyperglycémie chronique semble être un facteur important qui contribue à ce processus. La voie de signalisation de Gαq, est impliquée dans la régulation du tonus vasculaire (Harris *et al.*, 2007). Une perturbation de ce mécanisme peut contribuer aux complications vasculaires observées dans le diabète/hyperglycémie. Depuis quelques années, plusieurs études ont fait mention des anomalies dans la voie de signalisation de Gαq en condition de diabète et d'hyperglycémie. Les niveaux d'expression de Gαq, et l'activité du DAG et des PKC sont augmentés dans différents tissus provenant de modèles de rat STZ et BB (Inoguchi *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1999). Aussi, le traitement des cellules endothéliales aortiques et des CMLV avec une grande concentration de glucose induit une augmentation de l'activité du DAG et des PKC (Inoguchi *et al.*, 1992; Ramana *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1997). Cependant, aucune étude n'a été effectuée concernant les niveaux d'expression des protéines Gαq/11 et des PLCβ dans l'aorte de rats diabétiques ou des CMLV en présence d'une grande concentration de glucose.

Plusieurs altérations sont observées dans le diabète et l'hyperglycémie. Des études ont, par exemple, révélé une élévation des niveaux plasmatiques de l'Ang II et de l'ET-1 chez les patients diabétiques de type 1 et 2 (Lansang *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2002; Collier *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1993). Ce phénomène a été également rapporté dans différents modèles expérimentaux de diabète tels que des rats STZ, des souris db/db (Hargrove *et al.*, 2000; Wysocki *et al.*, 2006). Par ailleurs, d'autres études confirment que l'hyperglycémie peut induire la production de l'Ang II et de l'ET-1 dans les cellules endothéliales et les CMLV (Keynan *et al.*, 2004; Lavrentyev *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2000). De plus, l'augmentation du stress oxydatif est associée au diabète (de

type 1 et de type 2) et à l'hyperglycémie et semblerait jouer un rôle important dans les complications cardiovasculaires retrouvées dans le diabète et l'hyperglycémie (Baynes and Thorpe, 1999; Cai and Harrison, 2000). D'autre part, il a été observé que l'élévation des taux et de l'activité du DAG et des PKC, induite par l'hyperglycémie, ou dans les tissus diabétiques, est attribuée à l'augmentation du stress oxydatif (Kunisaki *et al.*, 1994). Par ailleurs, une autre anomalie observée dans le diabète et l'hyperglycémie est l'augmentation des niveaux et de l'activité aux récepteurs des facteurs de croissance comme l'EGF-R et le PDGF-R (Keynan *et al.*, 2004; Kyaw *et al.*, 2002). En se basant sur les observations rapportées dans la littérature, il est possible d'estimer que l'augmentation de la production de l'Ang II et de l'ET-1, du stress oxydatif et la transactivation aux récepteurs des facteurs de croissance, contribuent certainement aux altérations de la voie de signalisation de Gαq et aux complications vasculaires associées au diabète.

Dans la présente étude, nous avons, en premier lieu, examiné le taux d'expression des protéines Gαq/11 et de leurs molécules associées en condition d'hyperglycémie. En second lieu, nous avons étudié le mécanisme moléculaire par lequel l'hyperglycémie module la voie de signalisation de Gαq au niveau des CMLV.

Nous avons observé que le traitement des CMLV A10 avec 26 mM de glucose durant 72 heures augmente l'expression des protéines Gαq, et G11α. Cette hausse de l'expression des protéines Gq/11α est accompagnée d'une augmentation de l'expression des protéines PLCβ-1 et PLCβ-2, et non pas PLCβ-3. La présence de 26 mM de mannitol n'a toutefois pas affecté l'expression des protéines Gαq/11 et PLCβ1/2, indiquant que la surexpression des protéines Gαq/11 et de PLCβ1/2 est due à la présence de 26 mM glucose et non à une augmentation de l'osmolarité dû à la présence du 26 mM de glucose dans le milieu cellulaire. De plus, nous avons confirmé que les CMLV, provenant d'aorte de rats STZ, montrent une augmentation des taux de Gαq et

de PLC $\beta$ -1. Ces résultats sont appuyés par nos études préliminaires qui indiquent une augmentation de G $\alpha$ q/11 et de PLC $\beta$ <sub>1/2</sub> dans les aortes de rats STZ comparativement aux aortes de rats témoins (résultats non publiés). Ces résultats suggèrent que la présence de 26 mM de glucose peut mimer l'état diabétique. Une élévation des taux de G $\alpha$ q dans les nerfs sciatiques (Goraya *et al.*, 1995) et les cœurs (Yang *et al.*, 1999) de rats STZ a été aussi rapportée. Cependant, nos résultats sont en contradiction avec l'étude menée par Ceccarelli et ses collaborateurs. Ils ont montré une diminution de l'expression de G $\alpha$ q dans des péricytes rétiens de bovins exposés à 25 mM de glucose (Goraya *et al.*, 1995). De plus, une diminution des taux de G $\alpha$ q/11 dans les CMLV gastriques des rats STZ (10 semaines) a été rapportée (Lin *et al.*, 2000). Ces différences peuvent être expliquées par l'utilisation de différents types cellulaires et de leur origine. L'augmentation des taux de G $\alpha$ q/11 et de la PLC $\beta$ <sub>1/2</sub> est également reflétée dans leur fonction. Les CMLV en présence de 26 mM de glucose montrent une plus grande production d'IP<sub>3</sub> suite à une stimulation par l'ET-1. Abebe et MacLeod ont rapporté que la norépinéphrine induit une plus grande formation d'IP<sub>3</sub> lors de la contraction des aortes de rats STZ comparativement aux aortes des rats témoins (Abebe and MacLeod, 1991b). De plus, les artères provenant des rats STZ développent une plus grande réponse contractile après une stimulation avec la norépinéphrine, en comparaison avec les artères de rats témoins (Abebe and MacLeod, 1990a). Suites à ces données, nous suggérons que l'augmentation de la production d'IP<sub>3</sub> induite par l'ET-1 en présence de 26 mM de glucose ainsi que l'élévation de la contraction des artères diabétiques par la norépinéphrine pourraient être attribuée à la surexpression de G $\alpha$ q/11 et de la PLC $\beta$ <sub>1/2</sub>.

Le mécanisme par lequel l'hyperglycémie augmente les niveaux de G $\alpha$ q/11 et de PLC $\beta$ <sub>1/2</sub> n'est pas très bien défini. Nous avons démontré pour la première fois que l'Ang II et l'ET-1 contribuent à l'augmentation de l'expression des protéines G $\alpha$ q/11 et PLC $\beta$ <sub>1/2</sub>. Cette notion est supportée par nos résultats qui indiquent que l'utilisation de

l'antagoniste spécifique aux récepteurs AT<sub>1</sub> (losartan), ET<sub>A</sub> (BQ123) et ET<sub>B</sub> (BQ788) diminuent la surexpression de Gαq/11 et de PLCβ<sub>1/2</sub>. Ces résultats suggèrent que ces effets sont causés par une production autocrine de l'Ang II et de l'ET-1. À cet égard, une production locale de l'Ang II a été décrite dans les CMLV exposées à 23.1 mM de glucose (Lavrentyev *et al.*, 2007). De plus, il a été observé que l'Ang II seul stimule la synthèse de l'ET-1 au niveau des CMLV (Hahn *et al.*, 1990). Puisque l'hyperglycémie augmente les taux de l'Ang II dans les CMLV (Lewis *et al.*, 1993), il se pourrait que l'augmentation de l'Ang II induite par l'hyperglycémie contribue à l'élévation de la synthèse de l'ET-1 dans les CMLV. Nous avons également montré que le traitement des CMLV avec l'Ang II ou l'ET-1 augmente l'expression des protéines Gq/11α et PLCβ<sub>1/2</sub>. La présence de losartan, de BQ123 et de BQ788 a annulé l'effet de l'Ang II et de l'ET-1 sur l'expression des protéines Gαq/11 et PLCβ<sub>1/2</sub>. Ces résultats supportent l'hypothèse que les récepteurs AT<sub>1</sub> et ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> sont impliqués dans l'augmentation de l'expression de Gαq/11 et de PLCβ<sub>1/2</sub> induit par l'hyperglycémie.

Pour faire suite à nos résultats, nous avons étudié le mécanisme de signalisation que l'Ang II et l'ET-1 empruntent pour altérer l'expression des protéines Gαq/11 et PLCβ<sub>1/2</sub> en conditions d'hyperglycémie. L'Ang II et l'ET-1 induisent l'augmentation du stress oxydatif par la stimulation de la NAD(P)H oxydase (Touyz *et al.*, 2004). La contribution du NAD(P)H oxydase dans l'augmentation du stress oxydatif dans le cas du diabète et de l'hyperglycémie est bien documentée. Récemment, Liu et ses collaborateurs ont observé que l'augmentation de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> induite par l'hyperglycémie est abolie par l'apocynine, un inhibiteur spécifique de la NAD(P)H oxydase dans les CMLV. D'autre part, la roténone, un inhibiteur du complexe 1 de la chaîne respiratoire, le L-Name, un inhibiteur de la NO synthase et l'oxypurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, n'ont pas altéré l'augmentation de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> induite par l'hyperglycémie (Liu *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que la NAD(P)H

oxydase est responsable de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> induite par l'hyperglycémie dans les CMLV. Par conséquent, nous avons examiné la contribution des peptides vasoactifs dans la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> suite à l'activation de la NAD(P)H en conditions hyperglycémiques. L'utilisation du losartan, du BQ123 ou du BQ788 suggère que l'hyperglycémie augmente l'activité du NAD(P)H oxydase et de la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par les récepteurs AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. De plus, l'augmentation de l'expression des protéines p22phox et p47phox, sous-unités de la NAD(P)H oxydase, induite par 26 mM de glucose, diminuent suite au traitement des CMLV avec les antagonistes, le BQ123, le BQ788 et le losartan. Ces résultats suggèrent l'implication de l'Ang II et de l'ET-1 dans l'augmentation du stress oxydatif induite par l'hyperglycémie. En effet, des études ont rapporté que l'utilisation de candesartan, un antagoniste au récepteur AT<sub>1</sub> et le quinapril, un inhibiteur de l'ECA, atténuent l'augmentation de l'expression de p47phox dans les reins des rats STZ (Onozato *et al.*, 2002).

Bien que le rôle du stress oxydatif dans l'augmentation de l'activité du DAG et des PKC soit bien établi (Inoguchi *et al.*, 2000; Inoguchi *et al.*, 2003; Inoguchi and Nawata, 2005), aucune évidence directe nous montre le rôle du stress oxydatif dans l'augmentation des niveaux de Gαq/11 et de PLCβ<sub>1/2</sub> induit par l'hyperglycémie. Nous avons par conséquent étudié l'effet des antioxydants sur l'augmentation des niveaux de Gαq/11 et de PLCβ<sub>1/2</sub> induite par l'hyperglycémie. Le DPI, un inhibiteur du NAD(P)H oxydase a atténué l'effet de l'hyperglycémie sur l'expression de Gαq/11 et de PLCβ<sub>1/2</sub>. De même, le DPI a atténué également l'effet de l'hyperglycémie sur l'augmentation de la formation d'IP<sub>3</sub> induite par l'ET-1. Ces résultats suggèrent que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> produit par la NAD(P)H oxydase est impliquée dans l'augmentation des niveaux de Gαq/11 et de leurs signalisation suite à l'exposition des CMLV en condition hyperglycémique. Il a été prouvé que l'hyperglycémie augmente l'expression de iNOS et par conséquent, induit la production du NO (Spitaler and Graier, 2002). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> formé par l'activation de

la NAD(P)H oxydase est soit converti en  $H_2O_2$  par la SOD, soit interagit avec le NO pour former le  $ONOO^-$ . Pour vérifier la contribution des différents ERO dans l'augmentation des protéines  $G\alpha_q/11$  et  $PLC\beta_{1/2}$ , les CMLV ont été traitées avec les chélateurs de  $ONOO^-$ , le MnTBAP et l'acide urique, et le chélateur de  $H_2O_2$ , la catalase. Les résultats démontrent que la hausse des niveaux de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  induite par l'hyperglycémie n'est pas attribuée à l'effet du  $ONOO^-$ . En effet le MnTBAP et l'acide urique n'ont pas altéré l'élévation de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  observée dans les conditions hyperglycémiques. Néanmoins, l'utilisation de la catalase, un chélateur de  $H_2O_2$ , a diminué la surexpression des protéines  $G\alpha_q/11$  et  $PLC\beta_{1/2}$  induite par l'hyperglycémie comparativement au CMLV témoins. La catalase atténue également l'effet de l'hyperglycémie sur l'augmentation de la formation d' $IP_3$  induite par l'ET-1. D'un autre côté, la catalase diminue également la production d' $IP_3$  induite par l'ET-1 en condition normale de glucose. Cela suggère que l'augmentation d' $IP_3$  produite par l'ET-1 peut être attribuée à  $H_2O_2$ . En effet, des études menées par Wedgwood et ses collaborateurs (2005) montrent que l'ET-1 induit la production d' $H_2O_2$ . Il est possible que la production d' $H_2O_2$  induite par l'ET-1 contribue à l'augmentation d' $IP_3$  observée en présence de 5.5 mM de glucose. Ces résultats suggèrent l'implication de la molécule du  $H_2O_2$  dans l'augmentation des taux de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  et de leurs molécules associées dans les conditions hyperglycémies. Nos résultats proposent également que l'augmentation du  $H_2O_2$  est due à la hausse des niveaux du SOD cytosolique (SOD1) et non du SOD mitochondrial (SOD2). Nos résultats sont en accord avec Sharpe et ses collaborateurs, qui ont observé que l'hyperglycémie augmente les niveaux d'expression du SOD1 dans les CMLV provenant d'aortes de rats (Sharpe *et al.*, 1998). De plus, plusieurs études ont souligné que les niveaux des chélateurs du  $H_2O_2$ , tel le glutathione diminue en condition d'hyperglycémie dans les CMLV (Tachi *et al.*, 1998; Tachi *et al.*, 2001). En tenant compte de tous ces résultats, nous estimons qu'il soit possible que



l'augmentation d' $O_2^-$  et du  $H_2O_2$  induite par l'hyperglycémie puisse être responsable de l'augmentation de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  dans les A10 CMLV exposés à une grande concentration de glucose. Cette hypothèse est supportée par nos résultats qui indiquent que le traitement des CMLV avec du  $H_2O_2$  (50 $\mu$ M) augmente l'expression des protéines  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  (résultats non publiés).

Nous avons ensuite évalué l'implication des récepteurs aux facteurs de croissance PDGF-R et EGF-R, qui sont des cibles des ERO et des peptides vasoactifs (Ang II et ET-1), dans l'augmentation de  $G\alpha_q/11$  et de leurs molécules associées induite par l'hyperglycémie. Nos résultats sont les premiers à indiquer qu'en condition hyperglycémique la transactivation d'EGF-R et de PDGF-R contribue à l'augmentation de  $G\alpha_q/11$  et de leurs molécules associées. À cet égard, le traitement des CMLV avec les inhibiteurs d'EGF-R (AG1478) et de PDGF-R (AG1295) diminue l'augmentation des niveaux de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  induite par l'hyperglycémie. L'inhibition des récepteurs à l'EGF et au PDGF ramène au niveau contrôle l'augmentation de la formation d' $IP_3$  induite par l'ET-1 suite aux conditions d'hyperglycémie. Cette observation démontre clairement l'implication d'EGF-R et de PDGF-R dans la voie signalisation de PLC en condition d'hyperglycémie.

Il est bien connu que les récepteurs aux facteurs de croissance relaient leurs actions par la voie des MAPK et d'AKT. De plus, plusieurs études ont observé que l'augmentation de l'activité des MAPK et d'AKT induite par l'hyperglycémie contribue au dysfonctionnement vasculaire (Park *et al.*, 2000; Rajesh *et al.*, 2007). Le mécanisme par lequel l'hyperglycémie augmente l'activité des MAPK et d'AKT n'est pas bien élaboré. À cet égard, nos résultats ont montré que l'inhibition d'EGF-R et de PDGF-R diminue l'augmentation de la phosphorylation d'ERK 1/2 et d'AKT induite par l'hyperglycémie vers les niveaux de contrôle. Ces résultats suggèrent l'implication d'EGF-R et de PDGF-R dans l'augmentation de l'activité des MAPK et d'AKT induite

par l'hyperglycémie. Nous avons également démontré que le PD98059, inhibiteur des MAPKK et wortmannin inhibiteur d'AKT/PI3K diminuent l'augmentation des niveaux d'expression des protéines Gαq/11 et PLCβ<sub>1/2</sub>. En se basant sur ces résultats, nous estimons que la transactivation d'EGF-R et de PDGF-R qui active la voie des MAPK et d'AKT, pourrait être responsable de l'augmentation de l'expression des protéines Gαq/11 et PLCβ<sub>1/2</sub> induite par l'hyperglycémie.

Nous avons également examiné les mécanismes intracellulaires par lesquels l'hyperglycémie transactive les récepteurs à l'EGF et au PDGF. Nos résultats indiquent que PP2, un inhibiteur de c-Src, diminue l'augmentation de la phosphorylation d'EGF-R et de PDGF-R ainsi que l'expression des protéines Gαq/11 et PLCβ<sub>1/2</sub> induite par l'hyperglycémie vers les niveaux des CMLV témoins. Ces résultats suggèrent l'implication de c-Src dans la transactivation d'EGF-R et de PDGF-R induite par l'hyperglycémie et par conséquent à l'augmentation de l'expression des protéines Gαq/11 et de PLCβ<sub>1/2</sub>. De plus, comme PP2 diminue l'augmentation de la formation d'IP<sub>3</sub> induite par l'ET-1 en condition d'hyperglycémie, celui-ci révèle le rôle de c-Src dans l'augmentation de la production d'IP<sub>3</sub> induit par l'ET-1.

Le mécanisme par lequel l'hyperglycémie transactive c-Src, et par conséquent EGF-R et PDGF-R, n'est pas très bien défini. Il se pourrait que l'augmentation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observée dans le diabète et les conditions hyperglycémiques (Liu *et al.*, 2007; Sharpe *et al.*, 1998; Tachi *et al.*, 1998; Tachi *et al.*, 2001), puisse contribuer à l'augmentation de l'activité d'EGF-R, de PDGF-R et de c-Src. Cette notion est supportée par nos résultats préliminaires qui démontrent que la catalase ramène au niveau des CMLV témoins l'augmentation de la phosphorylation d'EGF-R et de PDGF-R (observations non publiées). Ces résultats suggèrent l'implication d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la transactivation des récepteurs à l'EGF et au PDGF. L'augmentation des niveaux de l'Ang II et de l'ET-1 est constatée dans les cas du diabète et des conditions

d'hyperglycémie. De plus, l'Ang II et l'ET-1 induisent l'augmentation du stress oxydatif par la stimulation de la NAD(P)H oxydase (Touyz *et al.*, 2004). L'augmentation des taux de l'Ang II et de l'ET-1 pourrait être également responsable de l'augmentation de la phosphorylation d'EGF-R et de PDGF-R induite par l'hyperglycémie. À cet égard, Ushio-Fukai et ses collaborateurs ont observé que l'augmentation de la phosphorylation d'EGF-R et de l'activation de c-Src induite par l'Ang II est inhibée par le traitement avec le DPI, le NAC, chélateur d'ERO et l'absélène, un chélateur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ushio-Fukai *et al.*, 2001). Ces observations montrent clairement l'implication du stress oxydatif dans l'augmentation de l'activité de c-Src et de la transactivation d'EGF-R induite par l'Ang II.

L'augmentation des niveaux de Gαq/11 et de leur signalisation par l'hyperglycémie dans les CMLV peut avoir un effet sur la réponse vasculaire. En effet, de nombreuses études indiquent que les désordres vasculaires dans le diabète sont associés avec une augmentation de la contractilité des vaisseaux sanguins suite à une stimulation endogène des peptides dont les récepteurs sont couplés aux protéines Gαq/11 (Cai and Harrison, 2000; Goto et al., 1996; Takigawa et al., 1995; Sadoshima and Izumo, 1996; Ushio-Fukai et al., 1998; Chen and Minneman, 2005) telles que la norépinephrine (Subramanian and MacLeod, 1999), l'Ang II (Arun and al., 2004), l'ET-1 (Murat and al., 1999). L'effet vasculaire de la NE, de l'Ang II et de l'ET-1 observé dans le diabète et l'hyperglycémie peut être dû à l'augmentation de leur récepteur (Sodhi and al., 2003) ou à l'augmentation de leur évènement signalétique (Arun and al., 2004) c'est-à-dire, à l'augmentation de la relâche et à l'influx calcique (Abebe et al., 1990b, 1994; Arun and al., 2005), du métabolisme des phosphoinositides (Abebe and MacLeod 1991a,b, 1992) et des PKC (Abebe and MacLeod, 1990a).

L'endothélium vasculaire est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, la perméabilité vasculaire et dans l'angiogenèse (Davignon and Ganz, 2004). Le tonus

vasculaire est régulé par plusieurs facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs produits par les cellules endothéliales vasculaires (CEV) tels que le NO, l'Ang II et l'ET-1 (Lüscher, 1990; Vane et al., 1990). Le dysfonctionnement endothélial est souvent associé à l'altération du tonus vasculaire observé dans le diabète (Abebe 2008). Elle se manifeste par une diminution de la vasorelaxation qui est dépendante de l'endothélium (Abebe, 2008), c'est-à-dire à une réduction de la relâche et/ou production des facteurs relaxants qui sont dérivés de l'endothélium (De Vriese et al., 2000). Il a été présenté que dans le diabète et les conditions d'hyperglycémie il y a une diminution de la synthèse et de l'activité de la eNOS (Papezikova et al., 2008), de la prostacycline (Cosentino et al., 2003) et une augmentation de la synthèse et de la relâche de l'ET-1 (Keynan et al., 2004) par les CEV. L'augmentation de la synthèse des peptides vasoactifs ainsi que de la diminution des facteurs vasorelaxants au niveau des cellules endothéliales contribueraient à une augmentation de la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. De plus, nos résultats, appuyés par d'autres études, suggèrent une production endogène de l'Ang II et de l'ET-1 des CMLV induite par l'hyperglycémie. En tenant compte de tous ces résultats, nous pouvons suggérer que la relâche de ces vasopeptides par les cellules endothéliales et celles des CMLV peut contribuer à l'augmentation locale des niveaux de l'Ang II et de l'ET-1 des CMLV dans le diabète et les conditions d'hyperglycémie. L'augmentation des taux locaux de ces peptides contribuerait à une plus grande production ERO ainsi qu'à l'augmentation de l'activité d'EGF-R et de PDGF-R. Ce qui aurait pour effet d'augmenter les niveaux de  $G\alpha_q$  et de  $G\alpha_{11}$  et de leur signalisation au niveau des CMLV causant alors une vasoconstriction exagérée des agents vasoconstricteurs qui relaient leur effet via leurs récepteurs couplés aux protéines  $G\alpha_q/11$  (Harris et al. 2007). De plus, la diminution de la synthèse ou de la relâche du NO et d'autres facteurs vasorelaxants au niveau des cellules endothéliales contribuerait également à l'augmentation exagérée de la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. À

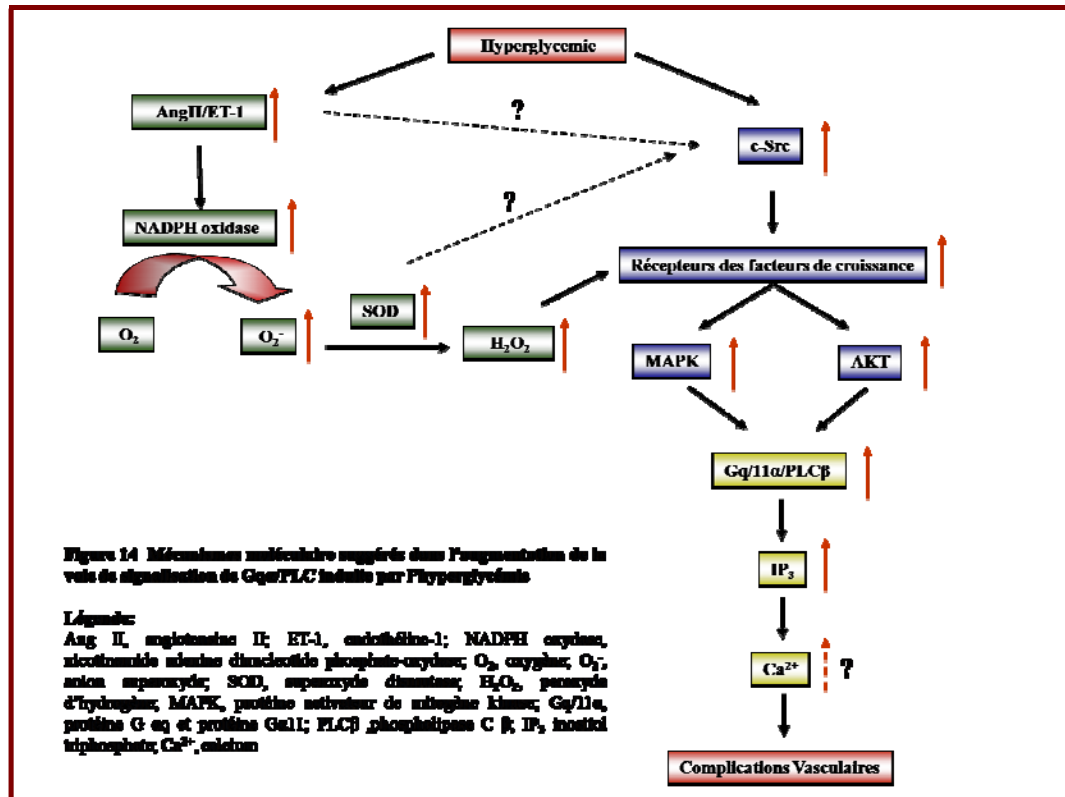
cet égard, Abebe a observé que les anneaux d'aortes de rats diabétique STZ, ainsi que les anneaux d'aorte de rat mis en présence d'une grande concentration de glucose avaient une plus grande contraction des CMLV suite à la stimulation par la phényléphrine et une altération de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium suite à une stimulation par l'acétylcholine (Abebe, 2008). Ces résultats suggèrent que les facteurs relâchés par l'endothélium ont une action paracrine sur les CMLV dans les cas de diabète et d'hyperglycémie.

## Conclusion générale

En conclusion, nous avons démontré pour la première fois que le diabète et l'hyperglycémie augmentent les niveaux d'expression des protéines  $G\alpha_q/11$  et  $PLC\beta_{1/2}$  dans les CMLV. De plus, nous avons émis les premières évidences qui démontrent que l'augmentation endogène de l'Ang II et de l'ET-1 induite par l'hyperglycémie, contribue à l'augmentation de la production d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$ . Cette hausse d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  entraîne pour sa part une augmentation du stress oxydatif. Ce dernier pourrait être responsable de l'augmentation des niveaux de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  induite par l'hyperglycémie (figure 14). Nous avons également prouvé que l'activation de c-Src par l'hyperglycémie contribue à la transactivation des récepteurs à l'EGF et au PDGF. Ces derniers pourraient contribuer à l'augmentation de l'expression de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$ , induite par l'hyperglycémie, par l'intermédiaire de la voie MAPK et d'AKT (figure 14). L'élévation de l'expression de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  résulte en une augmentation de la production d' $IP_3$ . Cette hausse, pour sa part, peut contribuer à l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire qui engendre des complications vasculaires telles qu'observées dans le diabète et les conditions hyperglycémiques (Park *et al.*, 2001) (figure 14). En effet, il est clairement établi que la voie de signalisation de  $G\alpha_q$  est impliquée dans l'hypertrophie et la prolifération des CMLV (Harris *et al.*, 2007; Ohtsu *et al.*, 2008; Tanski *et al.*, 2004). Ces anomalies amènent un dysfonctionnement des CMLV, par exemple une réponse exagérée aux agents vasoconstricteurs ou une réponse réduite aux agents vasodilatateurs (Harris *et al.*, 2007).

En se basant sur ces études, nous suggérons que l'utilisation des antioxydants, des antagonistes aux récepteurs  $AT_1$ ,  $ET_A$  et  $ET_B$ , des inhibiteurs de c-Src, d'EGF-R et de PDGF-R peut améliorer les altérations de la voie de signalisation  $G\alpha_q/PLC\beta$  et du calcium intracellulaire. Ces derniers peuvent donc être utilisés comme des agents

thérapeutiques potentiels pour le traitement des complications vasculaires observées dans le diabète.



## Perspectives

Nous croyons que les travaux présentés dans cette thèse sont le début de nouvelles aventures. Plusieurs points restent à être éclaircis. Il serait intéressant de vérifier l'implication de la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance par la production endogène des peptides vasoactifs induite par l'hyperglycémie au niveau des CMLV. Des études menées par Gomez et Anand-Srivastava (2008) ont indiqué l'implication de la production endogène de l'ET-1 et de l'Ang II dans la transactivation des récepteurs aux facteurs de croissance tels qu'EGF-R, PDGF-R et IGF-R dans les CMLV de rat SHR (Gomez et Anand-Srivastava., 2008). Il faudrait tester l'effet des antagonistes aux récepteurs AT<sub>1</sub>, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sur l'augmentation de l'activité d'EGF-R et de PDGF-R induite par l'hyperglycémie. De plus, jusqu'à présent, nous ne connaissons pas le mécanisme par lequel l'hyperglycémie augmente l'activité de c-Src. Des études révèlent que l'Ang II augmente l'activité de c-Src et ce par le stress oxydatif (Ushio-Fukai *et al.*, 2001). Il serait pertinent d'examiner l'effet de BQ123, BQ788 et du losartan ainsi que des antioxydants (ex. DPI, NAC, catalase) sur l'activité de c-Src en condition hyperglycémique.

Nos résultats indiquent clairement l'implication de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'augmentation de Gαq/11 et de PLCβ. Nous pourrions réaliser une étude dans le but de déterminer l'effet du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la voie de signalisation de Gαq. Pour évaluer cet aspect du projet, il faudrait incuber les CMLV avec des agents oxydants tels que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des études préliminaires obtenues dans notre laboratoire indiquent que le traitement des CMLV avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente l'expression des protéines Gαq, Gα11, PLCβ-1 et de PLCβ-2. Il faudrait également étudier l'implication d'EGF-R, de PDGF-R et de c-Src dans l'augmentation de Gαq/11 et de PLCβ induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Confirmer les résultats de la présente étude *in vitro* par des expérimentations *in vivo* seraient également conseillé. Des études préliminaires ont souligné une augmentation de l'expression des protéines  $G\alpha_q$ ,  $G11\alpha$ ,  $PLC\beta-1$  et  $PLC\beta-2$  au niveau des aortes de rats STZ. Ces études préliminaires indiquent également une augmentation des sous-unités de la NAD(P)H oxydase, p22phox et p47phox. Basé sur ces résultats, il faudrait étudier à l'aide d'antioxydants l'implication du stress oxydatif dans la voie de signalisation de  $G\alpha_q$  au niveau de l'aorte de rats STZ. De plus, il faudrait examiner, par l'intermédiaire d'antagonistes, la contribution des récepteurs de l'Ang II et de l'ET-1 sur l'augmentation du stress oxydatif et de la voie de signalisation de  $G\alpha_q$  dans l'aorte de rats STZ. Il serait également intéressant de connaître la contribution de c-Src, des récepteurs à l'EGF et au PDGF et des MAPK/AKT dans l'augmentation de  $G\alpha_q/11$  et de  $PLC\beta_{1/2}$  au niveau des aortes de rats STZ.

Plusieurs études ont observé une augmentation du calcium intracellulaire dans le cas du diabète et dans les conditions d'hyperglycémie (Abebe *et al.*, 1990b; Hattori *et al.* 1999; Park *et al.*, 2001). Ces études indiquent que l'entrée du calcium extracellulaire ainsi que la relâche calcique intracellulaire contribuent à l'augmentation calcique observée dans le diabète. Basé sur ces résultats, nous pourrions étudier l'implication de l'hyperglycémie et du diabète sur les niveaux du  $Ca_2^+$  intracellulaire dans les CMLV. Finalement, nous pourrions déterminer la contribution de l'élévation d' $IP_3$  sur les niveaux calciques cytosolique des CLMV dans le diabète et les conditions hyperglycémiques à l'aide d'antagonistes contre les récepteurs à l' $IP_3$  ex. le 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), et à l'aide d'un inhibiteur de PLC, le U-73122.

## Source Bibliographique

- Abebe, W (2008) Effects of taurine on the reactivity of aortas from diabetic rats. *Life Sci.* **82**:279-89.
- Abebe, W., Harris, K.H., and MacLeod, K.M. (1994) Role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in the selective enhancement of contractile responses of arteries from diabetic rats to noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol.* **72**:1544-51.
- Abebe, W., and MacLeod, K.M. (1991a) Enhanced arterial contractility to noradrenaline in diabetic rats is associated with increased phosphoinositide metabolism. *Can J Physiol Pharmacol.* **69**:355-61.
- Abebe, W. and MacLeod, K. M. (1991b) Influence of diabetes on norepinephrine-induced inositol 1,4,5-trisphosphate levels in rat aorta. *Life Sci* **49**, L85-L90.
- Abebe, W. and MacLeod, K. M. (1990a) Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol* **101**, 465-471.
- Abebe, W., Harris, K.H., and MacLeod, K.M. (1990b) Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J Cardiovasc Pharmacol.***16**:239-48
- Adams, J. W. and Brown, J. H. (2001) G-proteins in growth and apoptosis: lessons from the heart. *Oncogene* **20**, 1626-1634.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y. H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., and Iida, M. (2004) Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* **109**, 227-233.
- Akimoto, K., Takahashi, R., Moriya, S., Nishioka, N., Takayanagi, J., Kimura, K., Fukui, Y., Osada, S., Mizuno, K., Hirai, S., Kazlauskas, A., and Ohno, S. (1996) EGF or PDGF receptors activate atypical PKC $\lambda$  through phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J* **15**, 788-798.
- Albert, A.P., Saleh, S.N., Peppiatt-Wildman, C.M., and Large, W. (2007) A Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. *J Physiol.* **583**:25-36.
- Albert, A.P., and Large, W.A. (2003) Synergism between inositol phosphates and diacylglycerol on native TRPC6-like channels in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol.* **552**:789-95.
- Albert, A.P., and Large, W.A. (2002) A Ca<sup>2+</sup>-permeable non-selective cation channel activated by depletion of internal Ca<sup>2+</sup> stores in single rabbit portal vein myocytes. *J Physiol.***538**:717-28.
- Alberts, B., Johson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) Communication cellulaire. In: *Biologie Moléculaire de la cellule*, pp. 831-906. Paris.
- Allen, A. M., Zhuo, J., and Mendelsohn, F. A. (2000) Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* **13**, 31S-38S.

- Allison, J.H., Stewart, M.A. (1971) Reduced brain inositol in lithium-treated rats. *Nat New Biol.* **233**:267-8.
- Ambudkar, I.S., Ong, H.L., Liu, X., Bandyopadhyay, B.C., and Cheng, K.T. (2007) TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium.* **42**:213-23.
- Amiri, F., Viridis, A., Neves, M. F., Iglarz, M., Seidah, N. G., Touyz, R. M., Reudelhuber, T. L., and Schiffrin, E. L. (2004) Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* **110**, 2233-2240.
- Anand-Srivastava, M. B. (1989) Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat myocardial sarcolemma. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Biochem Pharmacol* **38**, 489-496.
- Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K., and Moller, N. P. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* **21**, 7117-7136.
- Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* **22**, 1276-1312.
- Aoki, H., Kobayashi, S., Nishimura, J., Yamamoto, H., and Kanaide, H. (1991) Endothelin induces the Ca<sup>2+</sup>-transient in endothelial cells in situ. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 1352-1357.
- Arai, H., Nakao, K., Takaya, K., Hosoda, K., Ogawa, Y., Nakanishi, S., and Imura, H. (1993) The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem.* **268**:3463-70.
- Ardanaz, N. and Pagano, P.J. (2006) Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med.* **231**:237-51.
- Arun, K.H., Kaul, C.L., and Ramarao, P. (2005) AT1 receptors and L-type calcium channels: functional coupling in supersensitivity to angiotensin II in diabetic rats. *Cardiovasc Res.* **65**:374-86.
- Arun, K.H., Kaul, C.L., and Ramarao, P. (2004) High glucose concentration augments angiotensin II mediated contraction via AT1 receptors in rat thoracic aorta. *Pharmacol Res.* **50**:561-8.
- Azumi, Houe, N., Takeshita, S., Rikitake, Y., Kawashima, S., Hayashi, Y., Itoh, H., and Yokoyama, M. (1999) Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* **100**, 1494-1498.
- Babior, B. M., Lambeth, J. D., and Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **397**, 342-344.
- Badr, K. F., Murray, J. J., Breyer, M. D., Takahashi, K., Inagami, T., and Harris, R. C. (1989) Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* **83**, 336-342.

- Banday, A. A., Siddiqui, A. H., Menezes, M. M., and Hussain, T. (2005) Insulin treatment enhances AT1 receptor function in OK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F1213-F1219.
- Barman, S. A., Zhu, S., and White, R. E. (2004) PKC activates BKCa channels in rat pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1275-L1281.
- Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. (1994) Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **14**, 5192-5201.
- Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**, 1-9.
- Belmadani, S., Palen, D. I., Gonzalez-Villalobos, R. A., Boulares, H. A., and Matrougui, K. (2008) Elevated epidermal growth factor receptor phosphorylation induces resistance artery dysfunction in diabetic db/db mice. *Diabetes* **57**, 1629-1637.
- Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C. H., Alitalo, K., and Eriksson, U. (2001) PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* **3**, 512-516.
- Berridge, M.J and Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. **341**(6239):197-205.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. **361**(6410):315-25.
- Berry, C., Hamilton, C. A., Brosnan, M. J., Magill, F. G., Berg, G. A., McMurray, J. J., and Dominiczak, A. F. (2000) Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* **101**, 2206-2212.
- Berthiaume, N., Yanagisawa, M., and Orleans-Juste, P. (2000) Contribution of endogenous endothelin-1 and endothelin-A-receptors to the hypertensive state of endothelin-B heterozygous (+/-) knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**, S72-S74.
- Bigaud, M., Pelton, J.T. (1992) Discrimination between ETA- and ETB-receptor-mediated effects of endothelin-1 and [Ala1,3,11,15]endothelin-1 by BQ-123 in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol*. **107**:912-8
- Birnbaumer, L. (1992) Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* **71**, 1069-1072.
- Bleeke, T., Zhang, H., Madamanchi, N., Patterson, C., and Faber, J. E. (2004) Catecholamine-induced vascular wall growth is dependent on generation of reactive oxygen species. *Circ Res* **94**, 37-45.
- Bockaert, J. and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **18**, 1723-1729.

- Bogoyevitch, M. A., Glennon, P. E., and Sugden, P. H. (1993) Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett* **317**, 271-275.
- Bolen, J. B., Rowley, R. B., Spana, C., and Tsygankov, A. Y. (1992) The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB J* **6**, 3403-3409.
- Brandes, R. P. and Kreuzer, J. (2005) Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* **65**, 16-27.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F., and Munoz, J. M. (1940) The substance causing renal hypertension. *J Physiol* **98**, 283-298.
- Bridges, T. M. and Lindsley, C. W. (2008) G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol* **3**, 530-541.
- Bromer, W., Winn, L., and Behrens, O. (1957) The amino acid sequence of glucagon V. Location of amide groups, acid degradation studies and summary of sequential evidence. *J Am Chem Soc* **79**:2807-2810.
- Brose, N., Betz, A., and Wegmeyer, H. (2004) Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 328-340.
- Budhiraja, S. and Singh, J. (2008) Protein kinase C beta inhibitors: a new therapeutic target for diabetic nephropathy and vascular complications. *Fundam Clin Pharmacol* **22**, 231-240.
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G. L. (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem* **270**, 24631-24634.
- Bunney, T. D. and Katan, M. (2006) Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends Cell Biol* **16**, 640-648.
- Burgering, B. M. and Coffey, P. J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**, 599-602.
- Busse, R., Luckhoff, A., and Mulsch, A. (1991) Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic Res Cardiol* **86 Suppl 2**, 7-16.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., and Hamm, H. E. (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**, 765-781.
- Cai, H. and Harrison, D. G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**, 840-844.
- Cali, J. J., Balcueva, E. A., Rybalkin, I., and Robishaw, J. D. (1992) Selective tissue distribution of G protein gamma subunits, including a new form of the gamma subunits identified by cDNA cloning. *J Biol Chem* **267**, 24023-24027.
- Campbell, M., Allen, W. E., Silversides, J. A., and Trimble, E. R. (2003) Glucose-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase-dependent

upregulation of the platelet-derived growth factor-beta receptor potentiates vascular smooth muscle cell chemotaxis. *Diabetes* **52**, 519-526.

Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P. J., and Gierschik, P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* **360**, 684-686.

Carrasco, S. and Merida, I. (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* **32**, 27-36.

Cazaubon, S., Parker, P. J., Strosberg, A. D., and Couraud, P. O. (1993) Endothelins stimulate tyrosine phosphorylation and activity of p42/mitogen-activated protein kinase in astrocytes. *Biochem J* **293 ( Pt 2)**, 381-386.

Cazaubon, S. M., Ramos-Morales, F., Fischer, S., Schweighoffer, F., Strosberg, A. D., and Couraud, P. O. (1994) Endothelin induces tyrosine phosphorylation and GRB2 association of Shc in astrocytes. *J Biol Chem* **269**, 24805-24809.

Ceccarelli, F., Rosa Mazzoni, M., and Chakravarthy, U. (2001) Binding characteristics of ET receptors in retinal pericytes and effects of high glucose incubation. *Curr Eye Res.* **23**:263-70.

Chan, S.H., Tai, M.H., Li, C.Y., and Chan, J.Y. (2006) Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med.***40**:2028-39.

Channon, K. M. and Guzik, T. J. (2002) Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* **53**, 515-524.

Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q., Mernaugh, R., and Carpenter, G. (1999) The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem* **274**, 26091-26097.

Chen, C. H., Cheng, T. H., Lin, H., Shih, N. L., Chen, Y. L., Chen, Y. S., Cheng, C. F., Lian, W. S., Meng, T. C., Chiu, W. T., and Chen, J. J. (2006) Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* **69**, 1347-1355.

Chen, Z.J., and Minneman, K.P. (2005) Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacol Sin.* **26**:1281-7.

Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131-140.

Chiarugi, P. and Cirri, P. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**, 509-514.

Chua, B. H., Krebs, C. J., Chua, C. C., and Diglio, C. A. (1992) Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol* **262**, E412-E416.

- Chung, J., Grammer, T. C., Lemon, K. P., Kazlauskas, A., and Blenis, J. (1994) PDGF- and insulin-dependent pp70s6K activation mediated by phosphatidylinositol-3OH kinase. *Nature* **370**, 71-75.
- Ciuffo, G. M., Alvarez, S. E., and Fuentes, L. B. (1998) Angiotensin II receptors induce tyrosine dephosphorylation in rat fetal membranes. *Regul Pept* **74**, 129-135.
- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 302-311.
- Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* **237**, 1555-1562.
- Cohen, S., Carpenter, G., and King, L., Jr. (1980) Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* **255**, 4834-4842.
- Collier, A., Leach, J. P., McLellan, A., Jardine, A., Morton, J. J., and Small, M. (1992) Plasma endothelinlike immunoreactivity levels in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* **15**, 1038-1040.
- Collins, S., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992) From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci.* **17**:37-9.
- Cooper, M.E., Bonnet, F., Oldfield, M., and Jandeleit-Dahm, K. (2001) Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens.* **14**:475-86.
- Cook, H. W. (1991) Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: *Biochemistry of lipids, Lipoproteins and Membranes*, pp. 141-169. Menlo Park, CA.
- Cooper, J. A. and Howell, B. (1993) The when and how of Src regulation. *Cell* **73**, 1051-1054.
- Cosentino, F., Eto, M., De Paolis, P., van der Loo, B., Bachschmid, M., Ullrich, V., Kouroedov, A., Delli Gatti, C., Joch, H., Volpe, M., and Lüscher, T.F. (2003) High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation.* **107**:1017-23.
- Cosentino, F., Sill, J. C., and Katusic, Z. S. (1994) Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension* **23**, 229-235.
- Cross, A. R. and Segal, A. W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* **1657**, 1-22.
- D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B., and Dorn, G. W. (1997) Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8121-8126.
- Danser, A. H. (1996) Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem* **157**, 211-216.

- Darley-USmar, V., Wiseman, H., and Halliwell, B. (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* **369**, 131-135.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**, 557-560.
- Davies, K. J. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* **262**, 9895-9901.
- Davignon, J. And Ganz, P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**: III-27-III-32.
- de Gasparo, M., Husain, A., Alexander, W., Catt, K. J., Chiu, A. T., Drew, M., Goodfriend, T., Harding, J. W., Inagami, T., and Timmermans, P. B. (1995) Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25**, 924-927.
- De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H., and Vanhoutte, P.M. (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* **130**:963-74.
- Denu, J.M., and Dixon, J.E. (1998a) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol.* **2**:633-41.
- Denu, J. M. and Tanner, K. G. (1998b) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**, 5633-5642.
- Dhanasekaran, N. and Dermott, J. M. (1996) Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* **8**, 235-245.
- Dhanasekaran, N., Prasad, M. V., Wadsworth, S. J., Dermott, J. M., and van, R. G. (1994) Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by G alpha 12 class of G proteins. *J Biol Chem* **269**, 11802-11806.
- Dietrich, A., Mederos, Y., Schnitzler, M., Kalwa, H., Storch, U., and Gudermann, T. (2005) Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **371**:257-65.
- Dietrich, A., Mederos, Y., Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., Obst, M., Yildirim, E., Salanova, B., Kalwa, H., Essin, K., Pinkenburg, O., Luft, F.C., Gudermann, T., Birnbaumer, L. (2005) Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol.* **25**:6980-9.
- Dorer, F. E., Kahn, J. R., Lentz, K. E., Levine, M., and Skeggs, L. T. (1972) Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung. *Circ Res* **31**, 356-366.
- Drin, G. and Scarlata, S. (2007) Stimulation of phospholipase Cbeta by membrane interactions, interdomain movement, and G protein binding--how many ways can you activate an enzyme? *Cell Signal* **19**, 1383-1392.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.



- Duerrschmidt, N., Wippich, N., Goettsch, W., Broemme, H. J., and Morawietz, H. (2000) Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 713-717.
- Dunlop, M. (2000) Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* **77**, S3-12.
- Duvall, W. L. (2005) Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med* **72**, 71-80.
- Dzau, V. J. (1989) Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens* **7**, 933-936.
- Eguchi, S. and Inagami, T. (2000) Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept* **91**, 13-20.
- Eguchi, S., Hirata, Y., Imai, T., and Marumo, F. (1993) Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. *Endocrinology*. **132**:524-9.
- Ekker, M., Tronik, D., and Rougeon, F. (1989) Extra-renal transcription of the renin genes in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5155-5158.
- Endoh, M., Fujita, S., Yang, H. T., Talukder, M. A., Maruya, J., and Norota, I. (1998) Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci* **62**, 1485-1489.
- Faenza, I., Bregoli, L., Ramazzotti, G., Gaboardi, G., Follo, M. Y., Mongiorgi, S., Billi, A. M., Manzoli, L., Martelli, A. M., and Cocco, L. (2008) Nuclear phospholipase C beta1 and cellular differentiation. *Front Biosci* **13**, 2452-2463.
- Faraci, F. M. and Didion, S. P. (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1367-1373.
- Fei, J., Viedt, C., Soto, U., Elsing, C., Jahn, L., and Kreuzer, J. (2000) Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1244-1249.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **11**, 507-517.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao A. (2006) A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. **441**:179-85.
- Fields, T. A. and Casey, P. J. (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* **321 ( Pt 3)**, 561-571.
- Filippi, C.M., Estes, E.A., Oldham, J.E., and von Herrath, M.G. (2009) Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *J Clin Invest*. **119**:1515-23.

- Forman, H. J. and Torres, M. (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* **166**, S4-S8.
- Forman, H. J., Torres, M., and Fukuto, J. (2002) Redox signaling. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 49-62.
- Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., and Tschlis, P. N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 727-736.
- Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**, 412-426.
- Freichel, M., Vennekens, R., Olausson, J., Hoffmann, M., Müller, C., Stolz, S., Scheunemann, J., Weissgerber, P., and Flockerzi, V. (2004) Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem Biophys Res Commun.* **322**:1352-8
- Frenette, P. S. and Wagner, D. D. (1996) Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* **334**, 1526-1529.
- Fridovich I. (1974) Editorial: Superoxide radical and the bactericidal action of phagocytes. *N Engl J Med.* **290**:624-5.
- Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**, 18515-18517.
- Frommer, K. W. and Muller-Ladner, U. (2008) Expression and function of ETA and ETB receptors in SSc. *Rheumatology (Oxford)* **47 Suppl 5**, v27-v28.
- Gao, Y. J. and Lee, R. M. (2001) Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A<sub>2</sub> production. *Br J Pharmacol* **134**, 1639-1646.
- Gether, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113.
- Gilbertson, D. G., Duff, M. E., West, J. W., Kelly, J. D., Sheppard, P. O., Hofstrand, P. D., Gao, Z., Shoemaker, K., Bukowski, T. R., Moore, M., Feldhaus, A. L., Humes, J. M., Palmer, T. E., and Hart, C. E. (2001) Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor. *J Biol Chem* **276**, 27406-27414.
- Gilman, A.G. (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*.**36**:577-9.
- Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* **56**:615-49.
- Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **19**, 257-267.
- Golovina, V.A., Platoshyn, O., Bailey, C.L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., Rubin, L.J, and Yuan, J.X. (2001) Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca<sup>2+</sup>

entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **280**:H746-55.

Gomez Sandoval Y.H. and Anand-Srivastava M. (2009) Implication des récepteurs aux facteurs de croissance dans la surexpression de Gi $\alpha$  induite par les peptides vasoactifs chez le SHR. *Médecine Science.* p15 (abstract)

Goraca, A. (2002) New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul* **36**, 161-167.

Goraya, T. Y., Wilkins, P., Douglas, J. G., Zhou, J., and Berti-Mattera, L. N. (1995) Signal transduction alterations in peripheral nerves from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurosci Res* **41**, 518-525.

Goto, K., Hama, H., and Kasuya, Y. (1996) Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol* **72**, 261-290.

Goto, K., Hozumi, Y., Nakano, T., Saino-Saito, S., and Martelli, A. M. (2008) Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective. *Tohoku J Exp Med* **214**, 199-212.

Graber, S. G., Figler, R. A., Kalman-Maltese, V. K., Robishaw, J. D., and Garrison, J. C. (1992) Expression of functional G protein beta gamma dimers of defined subunit composition using a baculovirus expression system. *J Biol Chem* **267**, 13123-13126.

Gray G (1995) Generation of endothelin. In: *Molecular Biology and Pharmacology of the Endothelins*, pp. 13-32. Ed Austin:RG Landes.

Griendling, K. K. (2006) NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1443-1445.

Griendling, K. K. (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* **90**, 491-493.

Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., and Alexander, R. W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**, 1141-1148.

Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassegue, B., and Ushio-Fukai, M. (2000a) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2175-2183.

Griendling, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000b) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**, 494-501.

Griendling, K. K., Tsuda, T., and Alexander, R. W. (1989) Endothelin stimulates diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **264**, 8237-8240.

Griendling, K.K., and Ushio-Fukai, M. (2000) Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept.* **91**:21-7.

- Gurbanov, K., Rubinstein, I., Hoffman, A., Abassi, Z., Better, O.S, and Winaver, J. (1996) Differential regulation of renal regional blood flow by endothelin-1. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* **271**: F1166-F1172
- Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2000) Insuline, glucagon et diabète sucré. In: *Pécis de physiologie médicale*, pp. 938-952. Ed Piccin. Padoue.
- Haber, F. and Willstätter, R. (1931) Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktions-Mechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. *Chem. Ber.***64**:2844-2854.
- Hahn, A. W., Resink, T. J., Scott-Burden, T., Powell, J., Dohi, Y., and Buhler, F. R. (1990) Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* **1**, 649-659.
- Haist, R.E. (1971) Functions of the islets of Langerhans. *Can Med Assoc J.* **105**:956-7
- Hallberg, B., Rayter, S. I., and Downward, J. (1994) Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem* **269**, 3913-3916.
- Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* **31**, 261-272.
- Hammacher, A., Mellstrom, K., Heldin, C. H., and Westermark, B. (1989) Isoform-specific induction of actin reorganization by platelet-derived growth factor suggests that the functionally active receptor is a dimer. *EMBO J* **8**, 2489-2495.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., and Cadenas, E. (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* **278**, 5557-5563.
- Harada, M., and Makino, S. (1984) Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia.* **27**:604-6.
- Hargrove, G. M., Dufresne, J., Whiteside, C., Muruve, D. A., and Wong, N. C. (2000) Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney. *Kidney Int* **58**, 1534-1545.
- Harris, D. M., Cohn, H. I., Pesant, S., Zhou, R. H., and Eckhart, A. D. (2007) Vascular smooth muscle G(q) signaling is involved in high blood pressure in both induced renal and genetic vascular smooth muscle-derived models of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H3072-H3079.
- Harris, I. S., Treskov, I., Rowley, M. W., Heximer, S., Kaltenbronn, K., Finck, B. N., Gross, R. W., Kelly, D. P., Blumer, K. J., and Muslin, A. J. (2004) G-protein signaling participates in the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **53**, 3082-3090.
- Harrison, D. G. (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* **100**, 2153-2157.
- Hashim, S., Li, Y., and Anand-Srivastava, M.B. (2006) G protein-linked cell signaling and cardiovascular functions in diabetes/hyperglycemia. *Cell Biochem Biophys.* **44**:51-64.

- Hashim, S., Li, Y., Nagakura, A., Takeo, S., and Anand-Srivastava, M. B. (2004) Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* **63**, 709-718.
- Hashim, S., Liu, Y. Y., Wang, R., and Anand-Srivastava, M. B. (2002) Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem* **240**, 57-65.
- Hattori, Y., Kawasaki, H., and Kanno, M. (1999) Increased contractile responses to endothelin-1 and U46619 via a protein kinase C-mediated nifedipine-sensitive pathway in diabetic rat aorta. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 104:73-80.
- Hawkins, P. T., Eguinoa, A., Qiu, R. G., Stokoe, D., Cooke, F. T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., and . (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* **5**, 393-403.
- He, J. Q., Pi, Y., Walker, J. W., and Kamp, T. J. (2000) Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type Ca<sup>2+</sup> current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. *J Physiol* **524 Pt 3**, 807-820.
- Heitzer, T., Wenzel, U., Hink, U., Krollner, D., Skatchkov, M., Stahl, R. A., MacHarzina, R., Brasen, J. H., Meinertz, T., and Munzel, T. (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* **55**, 252-260.
- Heldin, C. H., Eriksson, U., and Ostman, A. (2002) New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys* **398**, 284-290.
- Heldin, C. H., Ostman, A., and Ronnstrand, L. (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F79-113.
- Heldin, C. H. and Westermark, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* **79**, 1283-1316.
- Hendriks-Balk, M. C., Peters, S. L., Michel, M. C., and Alewijnse, A. E. (2008) Regulation of G protein-coupled receptor signalling: focus on the cardiovascular system and regulator of G protein signalling proteins. *Eur J Pharmacol* **585**, 278-291.
- Hepler, J. R. and Gilman, A. G. (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* **17**, 383-387.
- Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**, pp. 25-44.
- Hickey, K. A., Rubanyi, G., Paul, R. J., and Highsmith, R. F. (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* **248**, C550-C556.
- Hilenski, L. L., Clempus, R. E., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., and Griendling, K. K. (2004) Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 677-683.
- Hill, C. S. and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199-211.

- Hirano K. (2007) Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci*. **104** :109-15. Epub 2007 May 31.
- Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., Marumo, F. (1993) Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*. **91**:1367-73.
- Hirata, Y., Matsubara, H., Fukuda, Y., and Yoshimi, H. (1988) Cellular mechanism of atrial natriuretic factor secretion by cultured rat cardiocytes. *J Hypertens Suppl* **6**, S295-S296.
- Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemberton, A. J., and Wakelam, M. J. (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* **23**, 200-204.
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*. 1999 **397**:259-63.
- Hohler, B., Holzapfel, B., and Kummer, W. (2000) NADPH oxidase subunits and superoxide production in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Histochem Cell Biol* **114**, 29-37.
- Hokin, M. R. and Hokin, L. E. (1953) Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem* **203**, 967-977.
- Hollenberg, N. K., Fisher, N. D., and Price, D. A. (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* **32**, 387-392.
- Hooley, R., Yu, C. Y., Symons, M., and Barber, D. L. (1996) G alpha 13 stimulates Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways. *J Biol Chem* **271**, 6152-6158.
- Hosoda, K., Nakao, K., Hiroshi, A., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakami, G., Saito, Y., Nakanishi, S., and Imura, H. (1991) Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* **287**, 23-26.
- Hosoda, K., Nakao, K., Tamura, N., Arai, H., Ogawa, Y., Suga, S., Nakanishi, S., and Imura, H. (1992) Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem* **267**, 18797-18804.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. **55**:353-6
- Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A. J., Fantl, W. J., and Williams, L. T. (1995) Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* **268**, 100-102.
- Hu, Q., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Takeda, K., Irani, K., and Ziegelstein, R. C. (2002) Critical role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating Ca<sup>2+</sup> oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. *J Biol Chem* **277**, 32546-32551.

- Hunley, T.E., and Kon, V. (2001) Update on endothelins - biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol*. **16**:752-62.
- Hunyady, L. and Catt, K. J. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* **20**, 953-970.
- Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., and Nishizuka, Y. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* **6**, 477-480.
- Hollmann, M.W., Strumper, D., Herroeder, S., and Durieux, M.E.(2005) Receptors, G proteins, and their interactions. *Anesthesiology*. **103**:1066-78.
- Hynynen, M.M., and Khalil, R.A. (2006) The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. **1**:95-108.
- Inagami, T. (1998) A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. *Hypertension* **32**, 953-957.
- Inagami, T., Naruse, M., and Hoover, R. (1995) Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* **57**, 171-189.
- Iino M, Tsukioka M. (1994) Feedback control of inositol trisphosphate signalling bycalcium. *Mol Cell Endocrinol*. **98**:141-6.
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J. R., Heath, W., and King, G. L. (1992) Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11059-11063.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., and Nawata, H. (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945.
- Inoguchi, T. and Nawata, H. (2005) NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* **6**, 495-501.
- Inoguchi, T., Sonta, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., and Nawata, H. (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* **14**, S227-S232.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y. (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res*. **88**:325-32.

- Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M., and Masaki, T. (1989) The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* **264**, 14954-14959.
- Intengan, H.D., and Schiffrin, E.L. (2000) Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. **36**:312-8.
- Irvine RF. (1990) 'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**:5-9.
- Ishikawa, Y., and Homcy, C.J. (1997) The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res*.**80**:297-304.
- Ito, H., Hirata, Y., Hiroe, M., Tsujino, M., Adachi, S., Takamoto, T., Nitta, M., Taniguchi, K., and Marumo, F. (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* **69**, 209-215.
- Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., and Kaziro, Y. (1988) Presence of three distinct molecular species of Gi protein alpha subunit. Structure of rat cDNAs and human genomic DNAs. *J Biol Chem*.**263**:6656-64.
- Jalili, T., Takeishi, Y., and Walsh, R. A. (1999) Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G alpha q, PLC beta I, and PKC. *Cardiovasc Res* **44**, 5-9.
- Jhon, D. Y., Lee, H. H., Park, D., Lee, C. W., Lee, K. H., Yoo, O. J., and Rhee, S. G. (1993) Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *J Biol Chem* **268**, 6654-6661.
- Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., and Wasteson, A. (1982) Platelet-derived growth factor: identification of constituent polypeptide chains. *Biochem Biophys Res Commun* **104**, 66-74.
- Jones, S. A., O'Donnell, V. B., Wood, J. D., Broughton, J. P., Hughes, E. J., and Jones, O. T. (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* **271**, H1626-H1634.
- Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., and Plant, T.D. (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **282**:C347-59.
- Kanaide, H. (1996) Endothelin regulation of vascular tonus. *Gen Pharmacol* **27**, 559-563.
- Kanakaraj, P., Raj, S., Khan, S. A., and Bishayee, S. (1991) Ligand-induced interaction between alpha- and beta-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation. *Biochemistry* **30**, 1761-1767.
- Kanashiro, C. A. and Khalil, R. A. (1998) Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25**, 974-985.
- Kannel, W. B. and McGee, D. L. (1979) Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes Care* **2**, 120-126.



- Karet, F.E., Kuc, R.E., and Davenport, A.P. (1993) Novel ligands BQ123 and BQ3020 characterize endothelin receptor subtypes ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> in human kidney. *Kidney Int* **44**: 36-42, 1993
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-246.
- Karne, S., Jayawickreme, C. K., and Lerner, M. R. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* **268**, 19126-19133.
- Kasuya, Y., Abe, Y., Hama, H., Sakurai, T., Asada, S., Masaki, T., and Goto, K. (1994) Endothelin-1 activates mitogen-activated protein kinases through two independent signalling pathways in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 1325-1333.
- Katsuyama, M., Fan, C., and Yabe-Nishimura, C. (2002) NADPH oxidase is involved in prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF<sub>2</sub>α. *J Biol Chem* **277**, 13438-13442.
- Kawano, M., Koshikawa, T., Kanzaki, T., Morisaki, N., Saito, Y., and Yoshida, S. (1993) Diabetes mellitus induces accelerated growth of aortic smooth muscle cells: association with overexpression of PDGF beta-receptors. *Eur J Clin Invest* **23**, 84-90.
- Kazlauskas, A. and Cooper, J. A. (1989) Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* **58**, 1121-1133.
- Kedzierski, R. M. and Yanagisawa, M. (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 851-876.
- Kelly, J. D., Haldeman, B. A., Grant, F. J., Murray, M. J., Seifert, R. A., Bowen-Pope, D. F., Cooper, J. A., and Kazlauskas, A. (1991) Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation. *J Biol Chem* **266**, 8987-8992.
- Kessler, I. I. (1971) Mortality experience of diabetic patients. A twenty-six-year follow-up study. *Am J Med* **51**, 715-724.
- Keynan, S., Khamaisi, M., Dahan, R., Barnes, K., Jackson, C. D., Turner, A. J., and Raz, I. (2004) Increased expression of endothelin-converting enzyme-1c isoform in response to high glucose levels in endothelial cells. *J Vasc Res* **41**, 131-140.
- Kim, C. G., Park, D., and Rhee, S. G. (1996) The role of carboxyl-terminal basic amino acids in Gqα-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-β1. *J Biol Chem* **271**, 21187-21192.
- Kim, J.R., Yoon, H.W., Kwon, K.S., Lee, S.R., and Rhee, S.G. (2000) Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem*. **283**:214-21
- Kimball, C., and Murlin, J. (1923) Aqueous extracts of pancreas III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem* **58**:337-348.

- King, G. L., Kunisaki, M., Nishio, Y., Inoguchi, T., Shiba, T., and Xia, P. (1996) Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* **45 Suppl 3**, S105-S108.
- Klages, S., Adam, D., Class, K., Fargnoli, J., Bolen, J. B., and Penhallow, R. C. (1994) Ctk: a protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2597-2601.
- Kohler, N. and Lipton, A. (1974) Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res* **87**, 297-301.
- Koya, D. and King, G. L. (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47**, 859-866.
- Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* **103**, 21-80.
- Kundra, V., Escobedo, J. A., Kazlauskas, A., Kim, H. K., Rhee, S. G., Williams, L. T., and Zetter, B. R. (1994) Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature* **367**, 474-476.
- Kunisaki, M., Bursell, S. E., Umeda, F., Nawata, H., and King, G. L. (1994) Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* **43**, 1372-1377.
- Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Kirima, K., Suzaki, Y., Abe, S., Hasegawa, T., and Tamaki, T. (2002) Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogen-activated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). *Biochem Pharmacol* **64**, 1521-1531.
- Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Kirima, K., and Tamaki, T. (2001) Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res* **24**, 251-261.
- LaBelle, E. F. and Polyak, F. (1996) Phospholipase C beta 2 in vascular smooth muscle. *J Cell Physiol* **169**, 358-363.
- LaMorte, V. J., Thorburn, J., Absher, D., Spiegel, A., Brown, J. H., Chien, K. R., Feramisco, J. R., and Knowlton, K. U. (1994) Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* **269**, 13490-13496.
- Landmesser, U., Cai, H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo, H., Holland, S. M., and Harrison, D. G. (2002) Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* **40**, 511-515.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., Mitch, W. E., and Harrison, D. G. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* **111**, 1201-1209.

- Lansang, M. C., Stevanovic, R., Price, D. A., Laffel, L. M., and Hollenberg, N. K. (2005) ACE and non-ACE pathways in the renal vascular response to RAS interruption in type 1 diabetes mellitus. *Kidney Int* **67**, 1033-1037.
- Laplante, M. A., Wu, R., Moreau, P., and de, C. J. (2005) Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med* **38**, 589-596.
- Lassegue, B. and Clempus, R. E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R277-R297.
- Laufs, U., Adam, O., Strehlow, K., Wassmann, S., Konkol, C., Laufs, K., Schmidt, W., Bohm, M., and Nickenig, G. (2003) Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem* **278**, 5956-5962.
- Laursen, J. B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B. A., and Harrison, D. G. (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* **95**, 588-593.
- Lavrentyev, E. N., Estes, A. M., and Malik, K. U. (2007) Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **101**, 455-464.
- Lee, C. W., Lee, K. H., Lee, S. B., Park, D., and Rhee, S. G. (1994) Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J Biol Chem* **269**, 25335-25338.
- Lee, D. C., Fenton, S. E., Berkowitz, E. A., and Hissong, M. A. (1995) Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities. *Pharmacol Rev* **47**, 51-85.
- Lee, M. E., de la Monte, S. M., Ng, S. C., Bloch, K. D., and Quertermous, T. (1990) Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* **86**, 141-147.
- Lee, S. L., Wang, W. W., Finlay, G. A., and Fanburg, B. L. (1999) Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* **277**, L282-L291.
- Leiter, E.H (1989) The genetics of diabetes susceptibility in mice. *FASEB J.* **3**:2231-41
- Leu, T. H. and Maa, M. C. (2003) Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src. *Front Biosci* **8**, s28-s38.
- Leusen, J. H., Verhoeven, A. J., and Roos, D. (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med* **128**, 461-476.
- Lewis, E. J., Hunsicker, L. G., Bain, R. P., and Rohde, R. D. (1993) The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* **329**, 1456-1462.
- Li, J. M. and Shah, A. M. (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 19952-19960.

- Li, L., Fink, G. D., Watts, S. W., Northcott, C. A., Galligan, J. J., Pagano, P. J., and Chen, A. F. (2003) Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation* **107**, 1053-1058.
- Li, Y., Descorbeth, M., and Anand-Srivastava, M. B. (2008) Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of G $\alpha$  proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H2845-H2854.
- Li, Y., Hashim, S., and Anand-Srivastava, M.B. (2006) Intracellular peptides of natriuretic peptide receptor-C inhibit vascular hypertrophy via G $\alpha$ /MAP kinase signaling pathways. *Cardiovasc Res.* **72**:464-72.
- Liebmann, C. (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* **13**, 777-785.
- Lin, S., Kajimura, M., Takeuchi, K., Kodaira, M., Hanai, H., Nishimura, M., and Kaneko, E. (2000) Alterations of GTP-binding proteins (G $\alpha$  and Gq/11 $\alpha$ ) in gastric smooth muscle cells from streptozotocin-induced and WBN/Kob diabetic rats. *Dig Dis Sci* **45**, 1517-1524.
- Lincoln, T. M. (2007) Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions? *Circ Res* **100**, 10-12.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. Jr., and Meyer, T. (2005) STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol.* **15**:1235-41.
- Liu, S., Ma, X., Gong, M., Shi, L., Lincoln, T., and Wang, S. (2007) Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **42**, 852-863.
- Lopez, I., Mak, E. C., Ding, J., Hamm, H. E., and Lomasney, J. W. (2001) A novel bifunctional phospholipase c that is regulated by G $\alpha$  12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **276**, 2758-2765.
- Lopez-Illasaca, M., Li, W., Uren, A., Yu, J. C., Kazlauskas, A., Gutkind, J. S., and Heidaran, M. A. (1997) Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for activation of JNK/SAPKs by PDGF. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 273-277.
- Lounsbury, K. M., Hu, Q., and Ziegelstein, R. C. (2000) Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* **28**, 1362-1369.
- Lu, H. K., Fern, R. J., Luthin, D., Linden, J., Liu, L. P., Cohen, C. J., and Barrett, P. Q. (1996) Angiotensin II stimulates T-type Ca<sup>2+</sup> channel currents via activation of a G protein, Gi. *Am J Physiol* **271**, C1340-C1349.
- Lukic, M. L., Stosic-Grujicic, S., and Shahin, A. (1998) Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol* **6**, 119-128.
- Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Ostojic N, Chan WL, Liew FY. (1991) Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozocin in mice. *Biochem Biophys Res Commun.***178**:913-20

- Lüscher TF, Barton M. (2000) Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. **102**:2434-40.
- Lüscher, T.F. (1990) Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Am J Hypertens*. **3**:317-330
- Lyle, A. N. and Griendling, K. K. (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* **21**, 269-280.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*. **244**:6056-63.
- Macrez-Lepretre, N., Kalkbrenner, F., Morel, J. L., Schultz, G., and Mironneau, J. (1997) G protein heterotrimer  $\alpha_{13}\beta_{1}\gamma_{3}$  couples the angiotensin AT1A receptor to increases in cytoplasmic  $Ca^{2+}$  in rat portal vein myocytes. *J Biol Chem* **272**, 10095-10102.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2001) Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1 - 31), in human mammary and coronary arteries in vitro. *Br J Pharmacol* **134**, 1360-1366.
- Marieb, E. N. (1993) Le système endocrinien. In: *Anatomie et physiologie humaines*, pp. 540-575. Ed ERPI. Saint-Laurent.
- Marignani, P. A., Epand, R. M., and Sebaldt, R. J. (1996) Acyl chain dependence of diacylglycerol activation of protein kinase C activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 469-473.
- Marrero, M. B., Schieffer, B., Li, B., Sun, J., Harp, J. B., and Ling, B. N. (1997) Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* **272**, 24684-24690.
- Maturana, A. D., Casal, A. J., Demarex, N., Vallotton, M. B., Capponi, A. M., and Rossier, M. F. (1999) Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* **274**, 19943-19948.
- Meij, J. T. (1996) Regulation of G protein function: implications for heart disease. *Mol Cell Biochem* **157**, 31-38.
- Miller, A. A., Drummond, G. R., Schmidt, H. H., and Sobey, C. G. (2005) NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res* **97**, 1055-1062.
- Mittal, C. K. and Murad, F. (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4360-4364.
- Morgan, L., Broughton, P. F., and Kalsheker, N. (1996) Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol* **28**, 1211-1222.

- Mukherjee, S. P., Lane, R. H., and Lynn, W. S. (1978) Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents. *Biochem Pharmacol* **27**, 2589-2594.
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* **268**, 24539-24542.
- Murat, N., Kalkan, S., and Gidener S. (1999) Effect of verapamil on responses to endothelin-1 in aortic rings from streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* **40**:37-40.
- Muzaffar, S., Jeremy, J. Y., Angelini, G. D., Stuart-Smith, K., and Shukla, N. (2003) Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. *Thorax* **58**, 598-604.
- Naftilan, A. J. (1994) Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **3**, 218-227.
- Naftilan, A. J., Zuo, W. M., Ingelfinger, J., Ryan, T. J., Jr., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1991) Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest* **87**, 1300-1311.
- Nagata, N., Niwa, Y., and Nakaya, Y. (2000) A novel 31-amino-acid-length endothelin, ET-1(1-31), can act as a biologically active peptide for vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 595-600.
- Nahmias, C. and Strosberg, A. D. (1995) The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 223-225.
- Nakhooda, A.F., Like, A.A., Chappel, C.I., Wei, C.N., and Marliss, E.B.(1978) The spontaneously diabetic Wistar rat (the "BB" rat). Studies prior to and during development of the overt syndrome. *Diabetologia.* **14**:199-207.
- Nakhooda, A.F., Like, A.A., Chappel, C.I., Murray, F.T., and Marliss, E.B. (1977) The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes.* **26**:100-12.
- Nakano, A., Kishi, F., Minami, K., Wakabayashi, H., Nakaya, Y., and Kido, H. (1997) Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* **159**, 1987-1992.
- Naomi, S., Iwaoka, T., Disashi, T., Inoue, J., Kanesaka, Y., Tokunaga, H., and Tomita, K. (1998) Endothelin-1 inhibits endothelin-converting enzyme-1 expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *Circulation.* **97**:234-6.
- Neer, E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., and Brownlee, M.

(2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**, 787-790.

Offermanns, S. (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol.* **83**:101-30.

Offermanns, S., Zhao, L. P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M. I., and Wilkie, T. M. (1998) Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J* **17**, 4304-4312.

Ohtsu, H., Higuchi, S., Shirai, H., Eguchi, K., Suzuki, H., Hinoki, A., Brailoiu, E., Eckhart, A. D., Frank, G. D., and Eguchi, S. (2008) Central role of Gq in the hypertrophic signal transduction of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **149**, 3569-3575.

Oliverio, M. I., Kim, H. S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C. F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. (1998) Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15496-15501.

Onozato, M. L., Tojo, A., Goto, A., Fujita, T., and Wilcox, C. S. (2002) Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int* **61**, 186-194.

Papezikova, I., Pekarova, M., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I., Demopoulos, V., Kubala, L., and Lojek A. (2008) The effect of aldose reductase inhibition by JMC-2004 on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett.* **29**:775-8.

Parekh, A.B. and Putney J.W Jr.(2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* **85**:757-810.

Parekh, A.B., and Penner, R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* **77**:901-30.

Park, D., Jhon, D. Y., Lee, C. W., Lee, K. H., and Rhee, S. G. (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**, 4573-4576.

Park, J. Y., Takahara, N., Gabriele, A., Chou, E., Naruse, K., Suzuma, K., Yamauchi, T., Ha, S. W., Meier, M., Rhodes, C. J., and King, G. L. (2000) Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* **49**, 1239-1248.

Park, S.H., Choi, H.J., Lee, J.H., Yang, I.S., and Han, H.J. (2001) High glucose stimulates Ca<sup>2+</sup> uptake via cAMP and PLC/PKC pathways in primary cultured renal proximal tubule cells. *Kidney Blood Press Res.***24**:10-7.

Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Nikolaidis, N., Gill, D. L., and Snyder, S. H. (2005) Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* **30**, 688-697.

- Perez-Moreno, M., Avila, A., Islas, S., Sanchez, S., and González-Mariscal, L. (1998) Vinculin but not alpha-actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium. *J Cell Sci.* **111**:3563-71.
- Phillips, M. I., Speakman, E. A., and Kimura, B. (1993) Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* **43**, 1-20.
- Pollock, D. M. (1999) Chronic studies on the interaction between nitric oxide and endothelin in cardiovascular and renal function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 258-261.
- Pollock, D. M., Keith, T. L., and Highsmith, R. F. (1995) Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J* **9**, 1196-1204.
- Pollock, D. M. and Pollock, J. S. (2001) Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F144-F150.
- Prasad, M. V., Dermott, J. M., Heasley, L. E., Johnson, G. L., and Dhanasekaran, N. (1995) Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J Biol Chem* **270**, 18655-18659.
- Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M., and Ullrich, A. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res* **2**, 184-190.
- Price, J. E. and Fowkes, F. G. (1997) Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease. The epidemiological evidence. *Eur Heart J* **18**, 719-727.
- Prigent, S. A. and Lemoine, N. R. (1992) The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* **4**, 1-24.
- Putney, J.W. Jr. And McKay, R.R. (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*. **21**:38-46.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, K. K., and Harrison, D. G. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* **97**, 1916-1923.
- Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Batkai, S., Hasko, G., Liaudet, L., Drel, V. R., Obrosova, I. G., and Pacher, P. (2007) Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H610-H619.
- Ramana, K. V., Friedrich, B., Tammali, R., West, M. B., Bhatnagar, A., and Srivastava, S. K. (2005) Requirement of aldose reductase for the hyperglycemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **54**, 818-829.
- Rao, G. N. and Berk, B. C. (1992) Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* **70**, 593-599.
- Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L. M., and Robishaw, J. D. (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel



- forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J Biol Chem* **270**, 21765-21771.
- Rebecchi, M. J. and Pentylala, S. N. (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* **80**, 1291-1335.
- Resink, T. J., Scott-Burden, T., and Buhler, F. R. (1988) Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 1360-1368.
- Reth, M. (2002) Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* **3**, 1129-1134.
- Rey, F. E. and Pagano, P. J. (2002) The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1962-1971.
- Rhee, S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312.
- Rhee, S. G. and Bae, Y. S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* **272**, 15045-15048.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Netto, L. E., Seo, M. S., and Stadtman, E. R. (1999) A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors* **10**, 207-209.
- Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H., and Lee, S. Y. (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**, 546-550.
- Rich, S. and McLaughlin, V. V. (2003) Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation* **108**, 2184-2190.
- Roepstorff, K., Grovdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., and van, D. B. (2008) Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol* **129**, 563-578.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Veliçelebi, G., and Stauderman KA (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol.* **169**:435-45.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., and Harker, L. (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1207-1210.
- Roustan, P., Abitbol, M., Menini, C., Ribeau, F., Gerard, M., Vekemans, M., Mallet, J., and Dufier, J. L. (1995) The rat phospholipase C beta 4 gene is expressed at high abundance in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport* **6**, 1837-1841.
- Roy, S., Sen, C. K., and Packer, L. (1999) Determination of cell-cell adhesion in response to oxidants and antioxidants. *Methods Enzymol* **300**, 395-401.
- Rubanyi, G. M. and Botelho, L. H. (1991) Endothelins. *FASEB J* **5**, 2713-2720.

- Rueckschloss, U., Quinn, M. T., Holtz, J., and Morawietz, H. (2002) Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1845-1851.
- Runnels, L. W. and Scarlata, S. F. (1999) Determination of the affinities between heterotrimeric G protein subunits and their phospholipase C-beta effectors. *Biochemistry* **38**, 1488-1496.
- Sachidanandam, K., Harris, A., Hutchinson, J., and Ergul, A. (2006) Microvascular versus macrovascular dysfunction in type 2 diabetes: differences in contractile responses to endothelin-1. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 1016-1021.
- Sadoshima, J. (1998) Versatility of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **82**, 1352-1355.
- Sadoshima, J. and Izumo, S. (1996) The heterotrimeric G q protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J* **15**, 775-787.
- Sadoshima, J. and Izumo, S. (1993) Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res* **73**, 424-438.
- Saito, Y. and Berk, B. C. (2001) Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 3-7.
- Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., and Sugishita, Y. (1996) Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **384**, 353-355.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. **348**:732-5.
- Salamanca, D. A. and Khalil, R. A. (2005) Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol* **70**, 1537-1547.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**, 173-186.
- Scaltriti, M. and Baselga, J. (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* **12**, 5268-5272.
- Schachter, J. B., Lester, D. S., and Alkon, D. L. (1996) Synergistic activation of protein kinase C by arachidonic acid and diacylglycerols in vitro: generation of a stable membrane-bound, cofactor-independent state of protein kinase C activity. *Biochim Biophys Acta* **1291**, 167-176.
- Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**, 1191-1212.

- Schiffrin, E. L. (2001) Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* **14**, 83S-89S.
- Schiffrin, E. L. (1995) Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* **25**, 1135-1143.
- Schnabel, P., Gas, H., Nohr, T., Camps, M., and Bohm, M. (1996) Identification and characterization of G protein-regulated phospholipase C in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 2419-2427.
- Schneider, J. G., Tilly, N., Hierl, T., Sommer, U., Hamann, A., Dugi, K., Leidig-Bruckner, G., and Kasperk, C. (2002) Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am J Hypertens* **15**, 967-972.
- Schubert, J., and Wilmer, J.W. (1991) Does hydrogen peroxide exist "free" in biological systems? *Free Radic Biol Med.* **11**:545-55
- Seger, R. and Krebs, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**, 726-735.
- Seifert, R. A., Hart, C. E., Phillips, P. E., Forstrom, J. W., Ross, R., Murray, M. J., and Bowen-Pope, D. F. (1989) Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* **264**, 8771-8778.
- Sellak, H., Franzini, E., Hakim, J., and Pasquier, C. (1994) Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* **83**, 2669-2677.
- Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y., and Griendling, K. K. (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* **91**, 406-413.
- Sanger, F., and Thompson, E.O.(1953a) The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J.* **53**:353-66.
- Sanger, F., Thompson, E.O. (1953b) The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J.* **53**:366-74.
- Sanger, F., and Tuppy, H. (1951a) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J.* **49**:463-81.
- Sanger, F., Tuppy, H. (1951b) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem J.* **49**:481-90.
- Shanmugam, S., Corvol, P., and Gasc, J. M. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension* **28**, 91-97.
- Sharpe, P. C., Liu, W. H., Yue, K. K., McMaster, D., Catherwood, M. A., McGinty, A. M., and Trimble, E. R. (1998) Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile

- cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes* **47**, 801-809.
- Shaw, R. J. and Cantley, L. C. (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424-430.
- Shichiri, M., Kato, H., Marumo, F., and Hirata, Y. (1997) Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*. **30**:1198-203.
- Shirai, H., Takahashi, K., Katada, T., and Inagami, T. (1995) Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* **25**, 726-730.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., and Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808.
- Simonson, M. S. (1993) Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* **73**, 375-411.
- Simpson, P., McGrath, A., and Savion, S. (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* **51**, 787-801.
- Skeggs, L. T., Lentz, K. E., Gould, A. B., Hochstrasser, H., and Kahn, J. R. (1967) Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. *Fed Proc* **26**, 42-47.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., and Sternweis, P. C. (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**, 804-807.
- Smrcka, A. V. and Sternweis, P. C. (1993) Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *J Biol Chem* **268**, 9667-9674.
- Soboloff, J., Spassova, M., Xu, W., He, L.P., Cuesta, N., and Gill DL. (2005) Role of endogenous TRPC6 channels in Ca<sup>2+</sup> signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem*. **280**:39786-94.
- Sodhi, C. P., Kanwar, Y. S., and Sahai, A. (2003) Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H846-H852.
- Sohn, H. Y., Raff, U., Hoffmann, A., Gloe, T., Heermeier, K., Galle, J., and Pohl, U. (2000) Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol* **131**, 667-672.
- Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R. E., Szocs, K., Sorescu, G. P., Valppu, L., Quinn, M. T., Lambeth, J. D., Vega, J. D., Taylor, W. R., and Griendling, K. K. (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1429-1435.
- Spitaler, M. M. and Graier, W. F. (2002) Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* **45**, 476-494.

- Srivastava, A.K. (2002) High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med*. **9**:85-9.
- Steiner, D.F, and Oyer, P.E. (1967) The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*.**57**:473-480
- Sticherling, M. (2006) The role of endothelin in connective tissue diseases. *Rheumatology (Oxford)* **45 Suppl 3**, iii8-10.
- Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B. O., and Marklund, S. L. (1995) The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 2032-2036.
- Strathmann, M. P. and Simon, M. I. (1991) G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5582-5586.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983) Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. **306**(5938):67-9.
- Subramanian, R., MacLeod, K.M., (1999). Vascular reactivity in streptozotocin-induced diabetes. In: McNeill, J.H. (ED), *Experimental Models of diabetes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 153-175.
- Suh, P. G., Park, J. I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J. C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S., and Ryu, S. H. (2008) Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* **41**, 415-434.
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., and Lambeth, J. D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79-82.
- Summy, J. M. and Gallick, G. E. (2006) Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res* **12**, 1398-1401.
- Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., and Lai, F. A. (2006) PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 264-273.
- Szasz, T., Thakali, K., Fink, G. D., and Watts, S. W. (2007) A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 27-37.
- Tabet, F., Savoia, C., Schiffrin, E. L., and Touyz, R. M. (2004) Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **44**, 200-208.
- Tachi, Y., Okuda, Y., Bannai, C., Bannai, S., Shinohara, M., Shimpuku, H., Yamashita, K., and Ohura, K. (2001) Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue. *Life Sci* **69**, 1039-1047.

- Tachi, Y., Okuda, Y., Bannai, C., Okamura, N., Bannai, S., and Yamashita, K. (1998) High concentration of glucose causes impairment of the function of the glutathione redox cycle in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **421**, 19-22.
- Takigawa, M., Sakurai, T., Kasuya, Y., Abe, Y., Masaki, T., and Goto, K. (1995) Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem* **228**, 102-108.
- Takuwa, Y., Kasuya, Y., Takuwa, N., Kudo, M., Yanagisawa, M., Goto, K., Masaki, T., and Yamashita, K. (1990) Endothelin receptor is coupled to phospholipase C via a pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **85**, 653-658.
- Tallquist, M. and Kazlauskas, A. (2004) PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 205-213.
- Tang, C. M. and Insel, P. A. (2004) GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts. *Trends Cardiovasc Med* **14**, 94-99.
- Tanski, W. J., Roztocil, E., Hemady, E. A., Williams, J. A., and Davies, M. G. (2004) Role of Galphaq in smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg* **39**, 639-644.
- Taylor, C.W. and Richardson, A. (1991) Structure and function of inositol trisphosphate receptors. *Pharmacol Ther.* **51**:97-137.
- Taylor, S. J., Chae, H. Z., Rhee, S. G., and Exton, J. H. (1991) Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* **350**, 516-518.
- Taylor-Clark, T., and Udem, B.J. (2006) Transduction mechanisms in airway sensory nerves. *J Appl Physiol.* **101**:950-9. Epub 2006 Apr 27.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005-L1028.
- Timmers, S., Schrauwen, P., and de, V. J. (2008) Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* **94**, 242-251.
- Torres, M. and Forman, H. J. (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* **17**, 287-296.
- Touyz, R. M. (2005) Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* **90**, 449-455.
- Touyz, R. M. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1263-1273.
- Touyz, R. M. (2000) Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep* **2**, 98-105.
- Touyz, R. M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M. T., Pagano, P. J., and Schiffrin, E. L. (2002a) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* **90**, 1205-1213.

Touyz, R. M., Deschepper, C., Park, J. B., He, G., Chen, X., Neves, M. F., Viridis, A., and Schiffrin, E. L. (2002b) Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* **20**, 1127-1134.

Touyz, R. M., He, G., Deng, L. Y., and Schiffrin, E. L. (1999) Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* **99**, 392-399.

Touyz, R. M., He, G., Wu, X. H., Park, J. B., Mabrouk, M. E., and Schiffrin, E. L. (2001a) Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* **38**, 56-64.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* **122**, 339-352.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (1999a) Activation of the Na(+)-H+ exchanger modulates angiotensin II-stimulated Na(+)-dependent Mg<sup>2+</sup> transport in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Hypertension* **34**, 442-449.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (1999b) Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **34**, 976-982.

Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L. (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* **52**, 639-672.

Touyz, R. M., Wu, X. H., He, G., Park, J. B., Chen, X., Vacher, J., Rajapurohitam, V., and Schiffrin, E. L. (2001b) Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca<sup>2+</sup> signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* **19**, 441-449.

Touyz, R. M., Wu, X. H., He, G., Salomon, S., and Schiffrin, E. L. (2002c) Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased C-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **39**, 479-485.

Touyz, R. M., Yao, G., and Schiffrin, E. L. (2003) c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 981-987.

Touyz, R. M., Yao, G., Viel, E., Amiri, F., and Schiffrin, E. L. (2004) Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* **22**, 1141-1149.

Trepakova, E.S., Gericke, M., Hirakawa, Y., Weisbrod, R.M., Cohen, R.A., and Bolotina, V.M. (2001) Properties of a native cation channel activated by Ca<sup>2+</sup> store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **276**:7782-90.

Tribble, D. L. (1999) AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A

statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* **99**, 591-595.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* **252**:38-53.

Ushio-Fukai, M., and Alexander, R.W. (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem.* **264**:85-97.

Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., Lyons, P. R., Lassegue, B., and Griendling, K. K. (1999) Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **55**, 142-149.

Ushio-Fukai, M., Griendling, K. K., Akers, M., Lyons, P. R., and Alexander, R. W. (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* **273**, 19772-19777.

Ushio-Fukai, M., Griendling, K. K., Becker, P. L., Hilenski, L., Halleran, S., and Alexander, R. W. (2001) Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 489-495.

Vallega, G. A., Canessa, M. L., Berk, B. C., Brock, T. A., and Alexander, R. W. (1988) Vascular smooth muscle Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger kinetics and its activation by angiotensin II. *Am J Physiol* **254**, C751-C758.

Vane, J.R. Anggard, E.E., Botting R.M. (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* **323**:27-36

Vazquez, G., Wedel, B.J., Aziz, O., Trebak, M., and Putney, J.W. Jr. (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta.* **1742**:21-36.

Venkatachalam, K., Zheng, F., and Gill, D.L. (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem.* **278**:29031-40.

Venkatachalam, K., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Ma, H.T., and Gill, D.L. (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol.* **4**:E263-72.

Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.P. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science.* **312**:1220-3.

Vignais, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1428-1459.

Viswanathan, M. and Saavedra, J. M. (1994) Angiotensin II receptors subtypes and growth. In: *Angiotensin II receptors*, Ed PBMWM Timmermans. Plenum Press: New York.



- Vivanco, I. and Sawyers, C. L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1998) Physiologie moléculaire. In: *Biochimie*, pp. 1196-1304. Ed De Boeck Université. Paris, Bruxelles.
- Wakelam, M. J. (1998) Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim Biophys Acta* **1436**, 117-126.
- Wang, Z., Dohle, C., Friemann, J., Green, B.S, and Gleichmann, H. (1993) Prevention of high- and low-dose STZ-induced diabetes with D-glucose and 5-thio-D-glucose. *Diabetes*. **42**:420-8
- Wang, Y., Simonson, M. S., Pouyssegur, J., and Dunn, M. J. (1992) Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells. *Biochem J* **287 ( Pt 2)**, 589-594.
- Warner, T.D., Mitchell, J.A., de Nucci, G., and Vane, J.R. (1989) Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol*. **5**:S85-8
- Wassmann, S., Laufs, U., Baumer, A. T., Muller, K., Konkol, C., Sauer, H., Bohm, M., and Nickenig, G. (2001) Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* **59**, 646-654.
- Wassmann, S., Wassmann, K., and Nickenig, G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* **44**, 381-386.
- Watson, A. J., Katz, A., and Simon, M. I. (1994) A fifth member of the mammalian G-protein beta-subunit family. Expression in brain and activation of the beta 2 isotype of phospholipase C. *J Biol Chem* **269**, 22150-22156.
- Watts, S. W., Fink, G. D., Northcott, C. A., and Galligan, J. J. (2002) Endothelin-1-induced venous contraction is maintained in DOCA-salt hypertension; studies with receptor agonists. *Br J Pharmacol* **137**, 69-79.
- Wedgwood, S., and Black, S.M. (2005) Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **288**:L480-7.
- Wedgwood, S., Dettman, R. W., and Black, S. M. (2001) ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L1058-L1067.
- Weiss, R. B. (1982) Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep* **66**, 427-438.
- Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* **11**, 346-354.
- Wess, J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **80**, 231-264.

- Westermarck, B. and Wasteson, A. (1976) A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp Cell Res* **98**, 170-174.
- Wilcox, C. S. (2002) Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep* **4**, 160-166.
- Williams, B., Gallacher, B., Patel, H., and Orme, C. (1997) Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* **46**, 1497-1503.
- Woodsome, T. P., Eto, M., Everett, A., Brautigam, D. L., and Kitazawa, T. (2001) Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca<sup>2+</sup> sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol* **535**, 553-564.
- Wright, M. M. and McMaster, C. R. (2002) Phospholipid synthesis, diacylglycerol compartmentation, and apoptosis. *Biol Res* **35**, 223-229.
- Wu, D., Jiang, H., Katz, A., and Simon, M. I. (1993) Identification of critical regions on phospholipase C-beta 1 required for activation by G-proteins. *J Biol Chem* **268**, 3704-3709.
- Wysocki, J., Ye, M., Soler, M. J., Gurley, S. B., Xiao, H. D., Bernstein, K. E., Coffman, T. M., Chen, S., and Batlle, D. (2006) ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes* **55**, 2132-2139.
- Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T. S., Engerman, R. L., Oates, P. J., and King, G. L. (1994) Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* **43**, 1122-1129.
- Xian, C. J. (2007) Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev* **28**, 284-296.
- Yale, J.F. and Marliss, E.B. (1984) Altered immunity and diabetes in the BB rat. *Clin Exp Immunol.***57**:1-11.
- Yamada, T., Akishita, M., Pollman, M. J., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., and Horiuchi, M. (1998) Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* **63**, L289-L295.
- Yamawaki, H., Haendeler, J., and Berk, B. C. (2003) Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res* **93**, 1029-1033.
- Yan, C., Kim, D., Aizawa, T., and Berk, B. C. (2003) Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 26-36.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415.
- Yang, C. and Kazanietz, M. G. (2003) Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 602-608.

- Yang, J. M., Cho, C. H., Kong, K. A., Jang, I. S., Kim, H. W., and Juhn, Y. S. (1999) Increased expression of Galphaq protein in the heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Mol Med* **31**, 179-184.
- Yeatman, T. J. (2004) A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* **4**, 470-480.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M.D. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*. **443**:226-9
- Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A., and Yuan, J.X. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. **284**:C316-30.
- Zafari, A. M., Ushio-Fukai, M., Akers, M., Yin, Q., Shah, A., Harrison, D. G., Taylor, W. R., and Griendling, K. K. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* **32**, 488-495.
- Zagranichnaya, T.K., Wu, X., Danos, A.M., and Villereal, M.L. (2005) Gene expression profiles in HEK-293 cells with low or high store-operated calcium entry: can regulatory as well as regulated genes be identified? *Physiol Genomics*.**21**:14-33.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D.. (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca<sup>2+</sup> influx identifies genes that regulate Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**:9357-62.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., and Cahalan MD (2005) STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature*. **437**:902-5
- Zheng, X. L., Guo, J., Wang, H., and Malbon, C. C. (1998) Expression of constitutively activated G $\alpha$ 2 in vivo ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *J Biol Chem* **273**, 23649-23651.
- Zhou, Y., Dirksen, W. P., Zweier, J. L., and Periasamy, M. (2004) Endothelin-1-induced responses in isolated mouse vessels: the expression and function of receptor types. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H573-H578.
- Zhou, Y., Wing, M. R., Sondek, J., and Harden, T. K. (2005) Molecular cloning and characterization of PLC- $\eta$ 2. *Biochem J* **391**, 667-676.
- Zhu, Z., Zhang, S. H., Wagner, C., Kurtz, A., Maeda, N., Coffman, T., and Arendshorst, W. J. (1998) Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice. *Hypertension* **31**, 1171-1177.
- Zhuo, J., Moeller, I., Jenkins, T., Chai, S. Y., Allen, A. M., Ohishi, M., and Mendelsohn, F. A. (1998) Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens* **16**, 2027-2037.