HAL
open science

Etude de la régulation de la production de l'oxyde nitrique, dans les cellules endothéliales, en réponse à un ß bloquant de troisième génération à action antihypertensive : Implication des filaments d'actines du cytosquelette

Assia Kadi

To cite this version:

Assia Kadi. Etude de la régulation de la production de l'oxyde nitrique, dans les cellules endothéliales, en réponse à un ß bloquant de troisième génération à action antihypertensive : Implication des filaments d'actines du cytosquelette. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10113 . tel-01748483

HAL Id: tel-01748483

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748483

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Environnement

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

Spécialité : Ingénierie cellulaire et tissulaire

par **Assia KADI**

Etude de la régulation de la production de l'oxyde nitrique, dans les cellules endothéliales, en réponse à un β bloquant de troisième génération à action antihypertensive

Implication des filaments d'actine du cytosquelette

Soutenance prévue le 16 décembre 2008

DIRECTEUR DE THESE : Pr. P. MENU

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Mme Nadia JESSEL**	**CR1/INSERM, Université Louis Pasteur, Strasbourg**
	M Philippe FERNANDEZ	**PU-PH, Université Victor Segalen, Bordeaux 2**
Examinateurs :	**M Jean-François STOLTZ**	**PU-PH, UMR 7563 CNRS-UHP-INPL, Nancy**
	M Patrick MENU	**PU, UMR 7563 CNRS-UHP-INPL, Nancy**
Membres invités :	**Mme Martine Burger**	**Dr, Laboratoires Négma Lerads, Paris**
	M Pierre LABRUDE	**PU, Faculté de pharmacie, UHP, Nancy**

Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire - UMR 7563 CNRS

Faculté de Médecine - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

Avant-propos et remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563 (Faculté de Médecine de Nancy) et les laboratoires Négma Lerads (Paris-France).

A mes parents,

pour leur soutien, leurs sacrifices et leur amour, je leur dédie cette thèse

A Amel, Yacine et Hind

En mémoire de mes grands-parents ; KADI et OSMANE

A Zaher,

pour sa patience et son soutien

Remerciements

Mes travaux ont été réalisés au laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire de l'UMR-CNRS 7563 de l'Université Henri Poincaré de Nancy.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à :

- Monsieur le Professeur **Jean-François STOLTZ**, PU-PH, directeur du laboratoire et membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine, pour m'avoir accueillie avec bienveillance au sein de son équipe.
- Monsieur le Professeur **Patrick MENU**, Professeur à la Faculté de pharmacie de Nancy, pour avoir assuré la direction scientifique de cette thèse ainsi que le suivi permanent du déroulement des travaux.
- Madame le Docteur **Nadia JESSEL,** CR1 INSERM à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et Monsieur le Professeur **Philippe FERNANDEZ**, PU-PH à l'Université Victor Segalen de Bordeaux, pour avoir bien voulu accepter d'être rapporteurs de ma thèse.
- Madame le Docteur **Natalia de Isla**, Maître de conférences à la Faculté de médecine de Nancy, pour avoir minutieusement suivi mon travail. Les conseils qu'elle m'a prodigués au cours des périodiques et multiples rencontres que nous avons eues m'ont été d'un grand profit. Qu'elle veuille bien agréer l'expression de mon admiration et de ma sincère et profonde amitié.
- Madame le Docteur **Martine BURGER** qui, aujourd'hui, honore de sa présence le déroulement de l'exposé relatif à ma thèse, suite à l'invitation qui lui a été adressée.
- Monsieur **Pierre LABRUDE**, Professeur à la Faculté de pharmacie de Nancy, pour sa gentillesse, son aide précieuse et sa disponibilité dans la lecture et la correction de cette étude.

Je tiens également à remercier :

- Monsieur le docteur **Patrick LACOLLEY**, Directeur de recherche de l'unité INSERM 684, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et mis à disposition les équipements nécessaires au western blotting. Les recommandations qu'il m'a donné m'ont été d'une grande utilité.

Mes remerciements concernent aussi :

- l'ensemble des chercheurs, doctorants et personnels techniques du laboratoire pour l'atmosphère amicale qu'ils ont su faire régner, et surtout pour leur soutien indéfectible notamment :
  - le docteur **Sylvaine MULLER,** CR1 INSERM, pour m'avoir aidée lors de mon initiation aux travaux de recherche.
  - les docteur **Dominique DUMAS**, Ingénieur de recherche, et notre très regretté **Luc MARCHAL**, Ingénieur d'étude, pour leurs conseils concernant la microscopie confocale.
- Mes amies et collègues **Léticia** et **Huahua** ainsi que **Mariama**, **Shalaw** et **Vanessa** qui faisaient partie de l'équipe du laboratoire.

C'est grâce surtout à l'accueil chaleureux dont j'ai fait l'objet, au soutien de tous et à l'aide que j'ai toujours trouvée que j'ai le plaisir de présenter ma thèse.

Sommaire

Sommaire

Introduction générale **1**

Chapitre I :

Introduction bibliographique **4**

I- Le système circulatoire **5**

I.1- Architecture et anatomie du système circulatoire **5**

Les vaisseaux **5**

a) Les artères 5

b) Les veines 6

c) Les capillaires 6

I.2- Composition de la paroi vasculaire **7**

I.2.1- L'intima 8

I.2.2- La média 8

I.2.3- L'adventice 8

II- Fonction des cellules vasculaires **9**

II.1 – L'endothélium : Les CE **9**

II.1.1- Structure et propriétés de la CE 9

II.1.2- Fonctions de la CE 10

a) Barrière de perméabilité sélective 10

b) Action anti-thrombosante et thrombosante 11

c) Action vasomotrice 11

d) Propriétés anti-adhésive et adhésive 11

II.2- La cellule musculaire lisse (CML) **12**

II.2.1- Structure des CML 12

II.2.2- Fonctions des CML 13

III- La circulation sanguine 13

III.1- La pression sanguine 14

III.2- Les composantes hémodynamiques de la pression sanguine 15

III.2.1- Niveau de la pression artérielle systolique 15

III.2.2- Niveau de la pression artérielle diastolique 16

IV- La régulation de la TA 16

IV. 1- La régulation par la vasomotricité 16

IV.1.1- Contraction et relaxation de la fibre musculaire 17

Régulation du Ca^{+2} intracellulaire 17

IV.1.2- Vasomotricité endothélium-dépendante 19

V- L'oxyde nitrique (NO) 19

V.1- Voies de synthèse et action 20

Structure de la eNOS 20

V.2- Facteurs influençant la production du NO 21

V.2.1- Régulation de la transcription de la eNOS 22

V.2.2- Régulation co-translationnelle de la eNOS 24

V.2.3- Régulation post-translationnelle 24

V.3- Localisation et activation de la eNOS 25

V.3.1- Localisation de la eNOS dans les caveolae et interaction avec la cavéoline-1 25

V.3.2- Localisation de la eNOS dans l'appareil de Golgi 25

V.4- Phosphorylation et translocation de la eNOS 27

V.4.1- Phosphorylation 27

V.4.2- Translocation 28

V.5- Interaction de la eNOS avec le cytosquelette d'actine 28

V.5.1- Rappel de la structure du cytosquelette 28

V.5.2- Double rôle de la Rho-kinase dans le réarrangement du cytosquelette d'actine et dans l'activité de la eNOS 29

V.6- Activation de la eNOS par les forces de cisaillement 32

V.6.1- Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activation de la eNOS en réponse aux différents types de cisaillement 36

VI- L'hypertension artérielle (HTA) 38

VI.1- Le traitement de l'HTA 38

VI.1.1- Un traitement non médicamenteux (modification de l'hygiène de vie) 38

VI.1.2- Un traitement médicamenteux 38

VI.1.2.1- Ceux en interaction avec le système rénine-angiotensine 38

VI.1.2.2- Les antagonistes des récepteurs d'angiotensine (ARA) 38

VI.1.2.3- Les anticalciques (antagonistes calciques) 38

VI.1.2.4- Les diurétiques 39

VI.1.2.5- Les β bloquants 39

VI.2- Les récepteurs adrénergiques 39

VI.2.1- Les récepteurs α-adrénergiques 39

VI.2.2- Les récepteurs β adrénergiques 39

VI.3- Effets cardiovasculaires des récepteurs adrénergiques 40

VI.3.1- Les effets β1 40

VI.3.2- Les effets β2 et β3 41

VI.4- Mécanismes de l'effet antihypertenseur des β bloquants 44

VII- Traitements de l'HTA avec le Nébivolol 44

VII.1- Définition et structure de la molécule **44**

VII.2- Modes d'actions **45**

VII.2.1- Mécanisme dépendant de l'endothélium 46

VII.2.1.1- Implication des récepteurs β adrénergiques 46

VII.2.1.2- Implication de la eNOS et du complexe Ca^{+2}/calmoduline 46

Autres mécanismes possibles **47**

VII.2.1.3- Implication de la iNOS 47

VII.2.1.4- Implication des récepteurs 5-HT 47

VII.2.1.5- Implication de la phospholipase A2 48

VII.2.1.6- Implication des récepteurs P2Y (purinocepteurs) 48

VII.2.2- Mécanisme indépendant de l'endothélium 48

VIII- But de l'étude **60**

Chapitre II :

Matériels et méthodes **62**

I- Choix et culture des cellules endothéliales **63**

I.1- Réactifs et matériels **63**

I.1.1- Milieu de culture 63

1.1.2- Tampon de lavage HBSS 64

I.1.3- Tampon PBS (Phosphate buffered saline) 64

I.1.4- Solution de digestion (Trypsine-EDTA) 64

I.1.5- Support de cellules en culture 65

I.2. Préparation et culture des HUVEC **65**

I.2.1- Recueil des cordons 65

I.2.2 Procédure pour récolter des cellules endothéliales 65

a) Lavage de la veine ombilicale 65

b) Détachement des cellules 65

I.2.3- Evolution et entretien de la culture 66

I.3 Passage en subculture 66

I.3.1 Détachement des HUVEC 66

I.3.2 Viabilité cellulaire 66

I.3.3 Culture sur lames de verre 67

I.4 Critère d'identification 67

I.4.1 Aspect morphologique 67

I.4.2 Identification par le facteur von Willebrand 67

II. Stimulations et traitements des cellules 68

II.1 Stimulation mécanique 68

II.1.1 Exposition des cellules aux forces de cisaillement 68

a) Présentation du système de flux 69

b) Calibration du système de flux 70

II.2 Stimulations biochimiques 72

II.2.1 Nébivolol 72

II.2.2 Etude des perturbations de la structure et la polymérisation du cytosquelette d'actine 72

II.2.2.1 Cytochalasine D 73

II.2.2.2 Inhibiteur spécifique de la Rho-kinase 74

II.2.3 Inhibition directe de la voie impliquée dans la production du NO 74

II.2.3.1 Inhibiteur des Akt 75

II.2.3.2 Inhibiteur de la eNOS 75
II.2.4 Antagoniste des récepteurs adrénergiques β3 76
II.2.5 TNF-α 77
II.2.6 Nitroprussiate de sodium dihydrate (SNP) 77
III. Méthodes analytiques 78
III.1 Fluorescence – Immunofluorescence 78
III.1.1 Principe de l'immunomarquage indirect 78
a) La microscopie confocale 79
b) Marquage des molécules étudiées 80
c) Réactifs 82
d) Protocole 82
e) Marquages du cytosquelette d'actine et du noyau 82
III.1.2 Méthodes d'analyse des images 3D acquises par microscopie confocale
Caractérisation des indices d'élongation et angles d'orientation des cellules 83
III.2 Mesure de la production de NO 85
Mesure indirecte 85
III.3 Etude de l'expression de la eNOS et la eNOSp par Western blotting 86
III.3.1 Principe du Western blotting 86
III.3.2 Protocoles expérimentaux 87
II.3.2.1 Lyse des cellules 87
II.3.2.2 Dosage des protéines 87
II.3.2.3 Electrophorèse 88
II.3.2.4 Transfert 89

II.3.2.5 Marquage 90

II.3.2.6 Révélation par chimiluminescence 91

III.4 Evaluation de la cytotoxicité (nécrose cellulaire) 92

IV. Analyses statistiques 93

Chapitre III

Résultats et discussion 94

Partie I : Mise au point du modèle de culture 96

I.1 Caractérisation phénotypique des cellules et choix de la densité d'ensemencement 97

I.2 Réarrangement du cytosquelette d'actine sous contraintes de cisaillement et son impact sur l'activité de la eNOS 98

Discussion 104

Conclusion 1 106

I.3 Choix de la concentration du Nébivolol 107

Conclusion 2 109

I.4- Impact du Nébivolol sur le stress oxydatif 110

Conclusion 3 111

Partie II : Implication du cytosquelette d'actine dans le mode d'action du Nébivolol 112

II.1 Effet potentiel du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine, la production des nitrites et la localisation intracellulaire de la eNOS 112

Discussion 119

II.2 Effet du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine et la production des nitrites au cours du temps 122

Discussion 125

Contrôle 1 : influence d'un donneur direct de NO : Nitroprussiate de sodium dihydrate (SNP), sur la polymérisation des filaments d'actine ainsi que la production de NO au cours du temps **127**

Conclusion 4 **133**

Contrôle 2 : implication de la eNOS dans la voie d'action du Nébivolol **135**

2-1 Impact du NEB sur la phosphorylation de la eNOS au cours du temps 135

Conclusion 5 **139**

2-2 Impact de l'action du Nébivolol suite à l'inhibition de la voie de la eNOS 141

2-3 Implication éventuelle de la iNOS par le Nébivolol dans son mode d'action 146

Discussion **149**

Conclusion 6 **150**

Contrôle 3 : implication du Nébivolol dans l'action des adrénorécepteurs β3 **153**

Conclusion 7 **155**

Parie III : Effet du Nébivolol sur l'activité de la eNOS suite à la perturbation du cytosquelette d'actine 156

III.1- Choix des concentrations optimales en cytochalasine D et hydroxyfasudil **156**

III.2- Etat de l'inhibition de la production des nitrites en présence de Nébivolol suite à la déstabilisation du cytosquelette d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil **162**

Conclusion 8 **167**

Conclusion générale et perspectives **171**

Conclusion générale **172**

Perspectives **176**

Références bibliographiques **179**

Publications **199**

Liste des publications & communications affichées

Liste des publications

Publications dans des revues internationales

Kadi A, de Isla N, Lacolley P, Stoltz J.F, Menu P. Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells [Effect of rate and time of exposure]. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2007, 37: 131-40.

Stoltz J-F, Muller S, **Kadi A**, Decot V, Menu P, Bensoussan D. Introduction to endothelial cell biology. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2007, 37: 5-8.

Kadi A, Moby V, de Isla N, Lacolley P, Stoltz J.F, Menu P. Signalling transduction pathways implicated in Nebivolol induced NO production in endothelial cells. Biomedical Material and Engineering 2008, 00:1-5.

Moby V, **Kadi A**, de Isla N, Stoltz J-F, Menu P. Polyelectrolyte multilayer films: Effect of the initial anchoring layer on the growth of mesenchymal stem cells. Biomedical Material and Engineering (sous presse).

Publications dans des revues nationales

Kadi A, de Isla N, Menu P, Stoltz J.F. Mechanotransduction pathways implicated in NO production in endothelial cells treated with a selective β_1-adrenergic receptor antagonist. Actas de Bioquimica (sous presse).

Kadi A*, Decot V*, Menu P, Muller S, Bensoussan D, Stoltz JF. Mechanical forces and vascular endothelial cells. Pathologie et Biologie (sous presse).

Muller S, **Kadi A**, Bensoussan D, Menu P, Ouyan T. Traore M, Stoltz J-F. Introduction to endothelial cells mechanobiology. Actas de Bioquimica (sous presse).

Communications affichées

Kadi A, Fawzi-Grancher S, Lakisic G, L, De Isla N, Huselstein C, Stoltz JF, Muller S. Effect of cyclic stretching and TGFβ on the SMAD pathway. 3rd international meeting on bioengineering and biotherapies. France, Mai 2006.

Kadi A, Boura C, Devaux C, Lacolley P, Stoltz J.F, Menu P. Expression of e-NOS in Human Endothelial Cells under shear stress stimulation: assessed by confocale microscopy and quantitative RT-PCR. Endothelial cell in health and hypertension. Prague, République Czeck, Juin 2006.

Traoré M, **Kadi A**, Grancher-F S, Dumas D, Marchal L, Stoltz J-F, Muller S. Endocytosis degradation of LDL-Cholesterol in human endothelial cells under shear stress. 5th Congress of Biomechanics, Munich, Allemagne 2006.

Kadi A, de Isla N, Stoltz J.F, Menu P. Nitric oxide production in Human Endothelial Cells in Response to Shear Stress Stimulation and/or b1 Adrenergic Receptor Antagonist. Vascular wall and endothelium. Lisbonne, Portugal, Septembre 2007.

Stoltz J-F, Decot V, Muller S, **Kadi A**, Lacolley P, Menu P, Bensoussan D. Endothelial cell biology influence of mechanical forces. Vascular wall and endothelium. Lisbonne, Portugal, Septembre 2007.

Abréviations

Liste des abréviations

C° : Degré Celsius

Ac : Anticorps

ADN : Acide Déoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Ang II : Angiotensine II

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BH4 : Tétrahydrobioptérine

BSA : Albumine de sérum bovin

Ca^{+2} : Ions Calcium

CaMKII : Calmoduline -dependent kinase II

CAT-1 : Cationic amino acid transporter

CE : cellules endothéliales

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

cm : Centimètre

CML : Cellules musculaires lisses

CO2 : Dioxyde de carbone

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EGF : Epidermal growth factor

ET-1 : Endothéline-1

eNOS : Forme constitutive de la NO synthase dans l'endothélium

eNOSp : eNos phosphorylée

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FMN : Flavine mononucléotide

GAPDH : Glycéraldehyde 3-phosphate dehydrogénase

GC : Guanylate cyclase soluble

GMPc : Guanine monophosphate cyclique

HBSS : Hanks balanced solution

HO : Hème oxygénase

H_2O : Eau

HRP : Horseradish peroxidase

HSP : Protéines du choc thermique

HTA : Hypertension artérielle

HUVEC : Celllules endothéliales de veine ombilicale humaine

ICAM : Intracellular adhesion molecule

$IL_1\beta$: Interleukine 1 β

iNOS : Forme inductible de la NO synthase

IP : Iodure de propidium

IP3 : Inositol-3-phosphate

K^+ : Ions potassium

LDL : Low density lipoproteines

LPS : Lipopolysaccharides

lysoPC : Lysophosphatidylcholine

Mg^{2+} : Ions magnésium

MLCK : Kinase des chaînes légères de la myosine

Na^+ : Ions sodium

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit

NEB : Nébivolol

nNOS : Forme neuronale de la NO synthase

NO : Monoxyde d'azote

OH^- : Radical hydroxyle

ON : Ouverture numérique

$ONOO^-$: Peroxynitrites

O2 : Oxygène

Pa : Pascal

PAF : Paraformaldéhyde

PBS : Phosphate buffered saline

PECAM : Platelet-endothélial cell adhesion molecule

PGI_2 : Prostacycline

PH : Potentiel Hydrogène

PIP2 : Phosphatidyl-inositol-diphosphate

PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

P2Y : Purinocepteurs

RE : Réticulum endoplasmique

RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute

s : seconde

Ser : Sérine

SNP : Nitroprussiate de sodium dihydrate

TGF-β : Transforming growth factor-β

Thr : Thréonine

TNFα : Tumor necrosis factor α

UTCT : Unité de Thérapie Cellulaire et Tissus

UV : Ultra-violet

VCAM : Vascular cell adhesion molecule

VEGF : Vascular endothelial growth factor

vWF : Facteur von Willebrand

WP : Corps de Weibel-Palade

5-HTP : 5-hydroxytryptophane

5HT : Récepteurs sérotoninergiques

ΔV : Variation de volume

Δp : Variation de pression

λem : Longueur d'onde d'émission

λem : Longueur d'onde d'excitation

Liste des illustrations

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : structure de la paroi des trois types de vaisseaux sanguins. 7

Figure 2 : représentation schématique de la cellule endothéliale. 10

Figure 3 : régulation du Ca^{+2} intracellulaire. 18

Figure 4 : schéma des domaines constituant la eNOS et des cofacteurs impliqué dans son activité enzymatique. 21

Figure 5 : schéma présentant les différents éléments impliqués dans la

régulation de la eNOS. 23

Figure 6 : cycle d'activation/désactivation de la eNOS. 26

Figure 7 : mécanisme de polymérisation des filaments d'actine. 29

Figure 8 : schéma représentant le rôle de la Rho-kinase dans la stabilisation des filaments d'actine et la formation des fibres de stress dans la CE. 30

Figure 9 : schéma mettant en évidence le double rôle de la Rho-kinase dans la régulation de la structure du cytosquelette d'actine et l'activité de la eNOS. 31

Figure 10 : schéma présentant les deux types de cisaillement laminaire. Le profil transversal (parabolique) est caractéristique des petits vaisseaux et traduit un cisaillement laminaire. Le profil plat est caractéristique des gros vaisseaux et traduit un cisaillement pulsatile. 33

Figure 11 : schéma présentant un cisaillement turbulent caractérisé par la formation d'un tourbillon en aval d'une sténose (carré noir). 34

Figure 12 : les différentes voies impliquées dans l'activation de la eNOS en réponse à un cisaillement laminaire. 37

Figure 13 : structure chimique des deux énantiomères L et D composant la molécule de Nébivolol. 45

Figure 14 : schéma du système de culture sous contraintes de cisaillement. 70

Figure 15 : courbe étalon présentant l'évolution du débit (Q) en fonction de l'augmentation des graduations de la pompe péristaltique. 71

Figure 16 : formule chimique de la cytochalasine D ($C_{30}H_{37}NO_6$). 73

Figure 17 : formule chimique de l'hydroxyfasudil ($C_{14}H_{17}N_3O_3S$. HCl). 74

Figure 18 : formule chimique de l'inhibiteur des Akt ($C_{30}H_{58}O_{10}$). 75

Figure 19 : formule chimique de L-NAME ($C_7H_{12}N_5O_2$). 76

Figure 20: formule chimique de l'antagoniste des récepteurs β3 (SR59230A) ($C_{21}H_{27}NO_2$. $C_2H_2O_4$). 76

Figure 21 : formule chimique du donneur de NO SNP ($Na_2[Fe(CN)_5NO]\cdot 2H_2O$). 77

Figure 22 : schéma du principe de l'immunofluorescence indirecte. 79

Figure 23 : méthodes d'analyse de l'angle d'orientation et de l'indice d'élongation des cellules après marquage du cytosquelette d'actine. 84

Figure 24 : cytogrammes exprimant les angles d'orientations (à gauche) et les indices d'élongation (à droite) en fonction du nombre d'événements exploités avec le logiciel «Microcal Origin 6.0». 85

Figure 25 : principe de quantification des nitrites par la réaction de Griess. 86

Figure 26 : montage de transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane PVDF. 90

Figure 27 : schéma représentant l'exploitation de la chimiluminescence dans la révélation des protéines dans le western blotting. 92

Figure 28 : expression du vWF par des CE au 2ème passage ensemencées sur une lame de verre recouverte de gélatine, mise en évidence par marquage immunofluorescent indirect. 97

Figure 29 : étude de l'orientation et de l'élongation des CE soumises à des contraintes de cisaillement de 1,2 et 2 Pa pendant 6h. Les paramètres de morphologie cellulaire (orientation et élongation) ont été mesurés grâce au marquage immunofluorescent du cytosquelette d'actine avec la phalloïdine Alexa 488. 101

Figure 30 : étude de l'orientation et de l'élongation des CE soumises à des contraintes de cisaillement de 1,2 et 2 Pa pendant 24h. 102

Figure 31 : production des nitrites par les CE soumises à deux amplitudes de cisaillement (1,2 et 2 Pa) pendant deux périodes (6 et 24h). 103

Figure 32 : production des nitrites par les CE incubées pendant 6 et 24h en conditions statiques. 103

Figure 33 : expression des fibres de stress par les CE soumises ou non aux contraintes de cisaillement de 2 Pa/24h. 105

Figure 34 : production des nitrites par des CE incubées pendant une durée de 24h avec des concentrations croissantes de Nébivolol. 108

Figure 35 : contrôle de la viabilité de CE après 24h d'incubation avec des concentrations croissantes de Nébivolol. 109

Figure 36 : effet du Nébivolol sur l'éventuelle induction du stress oxydatif. Etude réalisée par marquage immunofluorescent de la HO-1. 111

Figure 37 : effet de la présence ou non de Nébivolol sur le remodelage du cytosquelette d'actine de CE soumises ou non aux forces de cisaillement. 115

Figure 38 : comparaison de l'expression des fibres de stress dans les CE incubées pendant 24h en présence ou non de Nébivolol et soumises ou non aux contraintes de cisaillement. 116

Figure 39 : production des nitrites par des CE incubées pendant 24h en présence ou non de Nébivolol et soumises ou non aux contraintes de cisaillement après 24h de culture. 117

Figure 40 : expression intracellulaire de la eNOS dans des CE incubées pendant 24h en présence ou non de Nébivolol, et soumises ou non aux forces de cisaillement. 118

Figure 41 : effet du Nébivolol sur la structure du cytosquelette d'actine au cours du temps sur des cellules non soumises au cisaillement. 124

Figure 42: rapport entre la production des nitrites et l'état de polymérisation des filaments d'actine dans les CE incubées avec le Nébivolol pendant différents temps. 125

Figure 43 : impact d'un donneur direct de NO (SNP) sur l'expression des fibres de stress au cours du temps. 128

Figure 44 : comparaison des profils d'expression des fibres de stress par les CE en présence ou non de Nébivolol ou de SNP. 132

Figure 45 : le mode d'action du Nébivolol implique les modification au niveau de la structure du cytosquelette d'actine. 134

Figure 46 : expression de la eNOSp par les CE au cours du temps en présence ou non de Nébivolol. 137

Figure 47: expression de la eNOSp après 30 min, 1h, 3h et 24h de culture en présence ou non de Nébivolol ; étude réalisée par western blotting. 139

Figure 48 : relation entre l'expression des fibres de stress, la phosphorylation de la eNOS et la production des nitrites. 140

Figure 49 : mise au point des concentrations des inhibiteurs de la Akt (A) et eNOS (L-NAME) (B) via l'étude de leur effet sur la production des nitrites après 24h d'incubation avec des CE. 142

Figure 50 : effet de l'inhibition de la Akt ou de la eNOS (L-NAME) sur la production des nitrites par les CE en présence ou non de Nébivolol, après 30min (A) et 24h (B) d'incubation. 145

Figure 51 : effet de l'inhibition des Akt sur la phosphorylation de la eNOS induite par le Nébivolol après 30 min de culture. L'expression de la eNOSp est réalisée par western blotting. 146

Figure 52 : expression de la iNOS dans des CE incubées pendant 24h avec le Nébivolol. 148

Figure 53 : hypothèse sur le rôle potentiel des récepteurs β3 dans la phosphorylation de la eNOS en réponse au Nébivolol. 152

Figure 54 : effet de l'inhibition des adrénorécepteurs β3 sur la production des nitrites par les CE après 30min (bleu) et 1h (rouge) d'incubation en présence ou non de Nébivolol. 154

Figure 55 : mise au point des concentrations de cytochalasine D (A) et d'hydroxyfasudil (B) via l'étude de leur effet sur la dépolymérisation des filaments d'actine ainsi que l'induction d'une nécrose cellulaire. 158

Figure 56 : effet de la perturbation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil sur la production des nitrites au cours du temps. 159

Figure 57 : localisation intracellulaire de la eNOS après 24h d'incubation des CE avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil. 160

Figure 58 : effet de la perturbation du cytosquelette d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil sur le remodelage du cytosquelette d'actine des CE en présence ou non de Nébivolol. 164

Figure 59 : effet de la perturbation du cytosquelette d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil sur la production des nitrites induite par le Nébivolol chez des CE après 24h d'incubation. 165

Figure 60 : localisation intracellulaire de la eNOS après 24h d'incubation des CE avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil en présence de Nébivolol. 166

Figure 61 : schéma résumé du mode d'action du Nébivolol sur les CE. 175

Figure 62 : schéma illustrant une hypothèse sur le rôle potentiel de la Rho-kinase dans le mode d'action du Nébivolol. 178

Liste des tableaux

Tableau 1 : données hémodynamiques du système vasculaire humain. 35

Tableau 2 : les différentes molécules possédant un effet agoniste ou antagoniste sur les trois types de récepteurs β adrénergiques (β1, β2 et β3). 42

Tableau 3 : les différents mécanismes d'action du Nébivolol étudiés dans la littérature. Les principales voies étudiées sont : l'implication de la eNOS, les récepteurs β1, β2 et β3, les récepteurs 5-HT, le complexe Ca^{+2}/calmoduline et l'endothélium. 50

Tableau 4 : calibration de la pompe péristaltique par détermination du débit correspondant à chaque graduation. 71

Tableau 5 : caractéristiques des anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence indirecte. 81

Tableau 6 : résumé des résultats obtenus 168

Introduction générale

Divers dysfonctionnements du système cardiovasculaire peuvent être dus à un déséquilibre dans la balance de production de substances vasoactives par les cellules endothéliales (CE), induisant des troubles dans la tonicité des parois artérielles. Dans ce travail, nous traitons spécifiquement le problème de l'hypertension artérielle (HTA). L'une des causes de cette maladie consiste en une carence dans la production de NO, qui a pour principale fonction la relaxation des cellules musculaires lisses (CML) dans le but d'adapter les vaisseaux aux fluctuations de la pression sanguine. NO est produit par les CE grâce à l'enzyme eNOS, en réponse à divers stimuli mécanique (cisaillement) ou biochimiques (acétylcholine, insuline, molécules pharmacologiques,…).

Le développement, par l'industrie pharmaceutique, de diverses classes de molécules, a apporté des traitements à ces problèmes cardiovasculaires, essentiellement la diminution de la pression artérielle. Dans cette étude, nous allons nous intéresser à une molécule de la classe des β bloquants. L'action de ces derniers est la conséquence du blocage des récepteurs β1 adrénergiques ou de l'activation des récepteurs β2 ou β3. Le Nébivolol qui est une molécule de la troisième génération des β bloquants, est reconnu comme étant un médicament à effet hypotenseur ; sa principale action réside dans son pouvoir de stimuler la production de NO par les CE. La recherche relative au mode d'action de cette molécule a fait et fait encore l'objet de plusieurs études, dont la majorité rapporte un mécanisme dépendant de la eNOS, cependant que certaines le décrivent même comme étant un agoniste des récepteurs β3.

Le but de ce travail réside dans la recherche d'une éventuelle voie d'action différente de celles décrites jusqu'à présent dans la littérature. Une étude bibliographique approfondie nous a fait remarquer le rôle clef que possède le cytosquelette d'actine dans la régulation de l'activité de la eNOS, et donc dans la production de NO. D'un autre côté, l'action du Nébivolol implique la production de NO. Ces deux éléments nous ont mené à penser que le Nébivolol implique les filaments d'actine du cytosquelette dans son mécanisme d'action. Dans un premier temps, nous avons mené notre étude dans les deux conditions statique et dynamique (cisaillement) afin de nous rapprocher des conditions physiologiques ; c'est ce qui compose la première partie de notre travail. Cette partie rassemble les mises au point du modèle de culture de CE avec ou sans contraintes de cisaillement et/ou Nébivolol. Les résultats obtenus dans cette partie nous ont permis d'émettre plusieurs hypothèses que nous

avons étudier uniquement dans les conditions statiques (sans cisaillement) dans un premier temps, avant de procéder aux expériences sous contraintes de cisaillement.

Nous avons choisi pour cette étude un modèle cellulaire bien connu dans la littérature, notamment pour les études effectuées sur le Nébivolol, qui fait appel aux « HUVEC » : cultures primaires de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine. Les principaux points traités dans la deuxième partie concernent l'effet du Nébivolol sur la structure des filaments d'actine, la localisation intracellulaire ainsi que la phosphorylation de la eNOS et la production des nitrites au cours du temps. Le facteur temps nous a paru très important dans le cadre d'une étude du mode d'action d'une molécule pharmacologique, du fait qu'en règle générale, ces molécules ont un effet limité dans le temps en raison de leur élimination par l'organisme. Nous avons ensuite étudié l'implication de la eNOS et de la Akt (kinase impliquée dans la phosphorylation de la eNOS) à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de ces deux enzymes. En référence à des données bibliographiques, nous avons également vérifié l'éventuel effet du Nébivolol sur l'expression de la iNOS et l'implication des récepteurs β3 dans son mode d'action.

Les conclusions de nos expériences nous ont permis d'établir une relation entre Nébivolol/cytosquelette/eNOS/NO.

Chapitre I

Introduction bibliographique

I- Le système circulatoire

Pour que le corps puisse se maintenir en vie, chacune de ses cellules doit pouvoir bénéficier d'un apport continu de nutriments et d'O_2. De plus, le CO_2 et les autres déchets cellulaires doivent être éliminés. Le système circulatoire a justement pour tâche d'alimenter les cellules en nutriments essentiels et en O_2, et de les débarrasser de leurs déchets grâce à un réseau très dense de vaisseaux sanguins composé d'artères (apport de nutriments et d'O_2) et de veines (transport de CO_2 et d'autres déchets). Les artères et les veines sont reliées par un ensemble de petits vaisseaux secondaires, les artérioles et les veinules, complétées par un réseau de vaisseaux microscopiques, les capillaires, qui relient les artères et les veines aux tissus de l'organisme et sont le siège des échanges gazeux (O_2 et CO_2) et autres. Dans ce système complexe, le cœur joue le rôle d'une pompe grâce au volume de sang qu'il pulse dans les artères, 70 fois par minute environ.

I.1- Architecture et anatomie du système circulatoire

Le système cardiovasculaire est composé du cœur et des vaisseaux (artères, artérioles, veines, veinules et capillaires).

Les vaisseaux

Ils forment un réseau dense de transport du sang dans toutes les régions de l'organisme et comprennent des artères, des artérioles, des capillaires, des veinules et des veines.

a) Les artères

Ce sont de gros vaisseaux qui, partant du cœur, se ramifient pour devenir des artérioles. Ils distribuent le sang éjecté du ventricule gauche vers les différents organes et tissus. Les artères qui partent du cœur sont les plus grosses, élastiques ou conductrices telle l'aorte et ses ramifications. Ces artères ont une faible résistance car elles doivent être en mesure de se dilater pour supporter les changements continuels de pression engendrés par les battements cardiaques.

Les grosses artères donnent naissance à des artères musculaires ou distributrices dont le diamètre va du petit doigt à celui d'une mine de crayon, qui apportent le sang aux organes et ont un rôle plus actif dans la vasoconstriction que les premières, mais en étant moins

extensibles. Les artères distributrices se ramifient en artérioles dont le diamètre est inférieur à 0,3 mm. Les artérioles, par la variation de leur diamètre, permettent au sang d'irriguer ou de contourner une région renfermant plusieurs capillaires (lits capillaires) ; c'est ainsi que l'organisme peut détourner le sang d'une région à une autre afin de répondre à une demande selon la dilatation des artérioles.

b) Les veines

Les veines se comportent non seulement comme des conduits dans lesquels le sang chargé de CO_2 et de déchets de dégradation du fonctionnement cellulaire, chemine depuis les capillaires jusqu'au cœur, mais aussi comme des réservoirs dont la capacité totale varie en fonction des variations du volume sanguin. Si par exemple le volume sanguin augmente, l'essentiel de l'augmentation (98%) sera absorbé par le système veineux, 2% seulement se répartissant dans le système artériel et capillaire ; inversement une diminution du volume sanguin se traduira par une diminution du volume du système veineux. Cette propriété est due en grande partie à la structure mince des parois vasculaires des veines ainsi qu'à leurs importantes capacités de dilatation. De plus, les veines possèdent une lumière plus grande que celle des artères correspondantes. Etant situées plus loin de l'action du pompage du cœur, la pression à l'intérieur est plus faible.

La circulation veineuse est assurée par deux réseaux de veines : superficiel et profond. Ces deux réseaux communiquent entre eux par des veines perforantes. Les veines superficielles collectent le sang des tissus superficiels des membres et le conduisent dans les veines profondes. Les grosses veines contiennent dans leur tunique externe des fibres musculaires lisses longitudinales qui, en se contractant, favorisent la circulation. De plus elles sont munies de valvules qui empêchent le reflux du sang.

c) Les capillaires

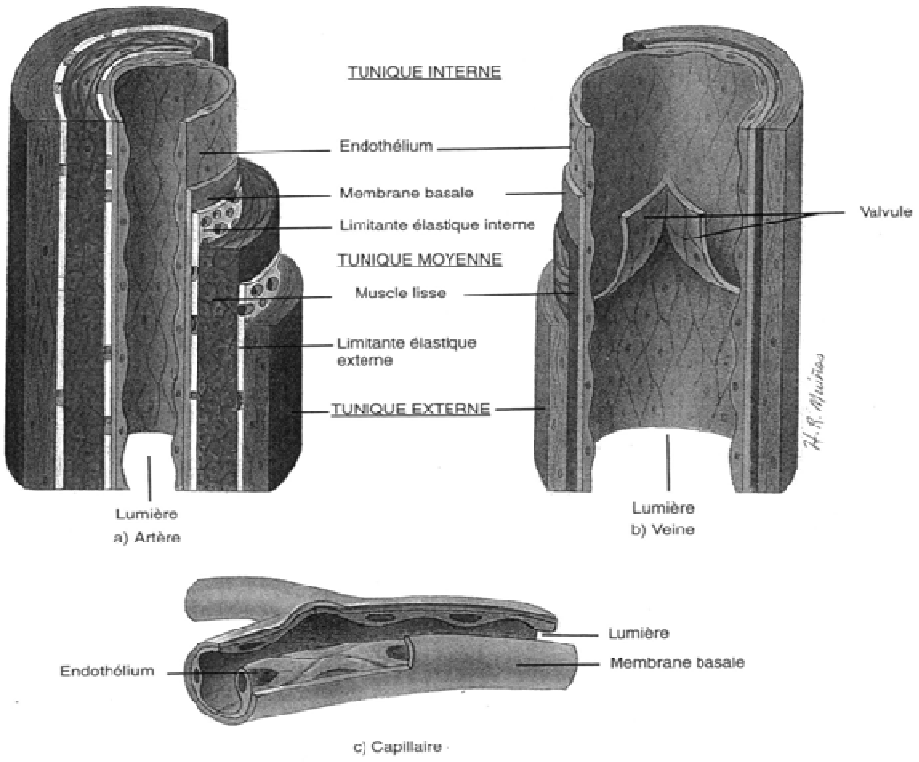
Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins du corps, ils ont un diamètre de 3 à 30 µm. Ils sont connectés aux artères et aux veines, et interagissent de près avec les tissus. Ils ont pour rôle de fournir les nutriments et l'O_2 aux cellules et de les débarrasser du CO_2 et autres déchets. Les capillaires ont tendance à se regrouper en réseaux appelés lits capillaires comportant de 10 à 100 capillaires selon l'organe ou le tissu. Le sang débouche dans le lit capillaire par une petite artériole appelée métartériole pourvue d'un sphincter précapillaire qui

agit comme une valvule permettant ou non l'écoulement sanguin dans le lit capillaire selon qu'elle est ouverte ou fermée.

I.2- Composition de la paroi vasculaire

La structure des parois vasculaires est différente selon la nature du vaisseau considéré. Les capillaires sont formés de cellules endothéliales (CE) unies au niveau de leurs bords par des jonctions anatomiques étanches appelées aussi « cément intracellulaire ». Cette structure fine de 1µM d'épaisseur permet les échanges rapides de substances entre le sang contenu dans les capillaires et les espaces interstitiels des tissus. A travers les cellules endothéliales, deux types de transport bien connus sont mis en jeu : passif pour les substances liposolubles et actif pour les substances non liposolubles.

Au fur et à mesure que l'on s'éloigne du lit capillaire, la structure microscopique de la paroi vasculaire évolue. D'une manière générale, les parois des artères et des veines sont constituées de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la média et l'adventice (figure 1).



<u>Figure 1 :</u> structure de la paroi des trois types de vaisseaux sanguins (http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio902)

I.2.1- L'intima

C'est la tunique la plus interne et la plus fine, elle se compose de la lumière vers la média de :

- Une monocouche de CE : imbriquées les unes dans les autres et formant une couverture étanche.

- Une couche de tissu conjonctif fibro-élastique : le tissu conjonctif contient des fibres de collagène, quelques fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes qui produisent des protéoglycannes, des glycosaminoglycannes – en particulier des héparane-sulfates– du glycogène, de l'élastine et de la laminine. Elle renferme également un grand nombre de cellules du système immunitaire.

I.2.2- La média

C'est la tunique moyenne ; elle est la plus épaisse et elle est constituée :

- Essentiellement de cellules musculaires lisses (CML) : repliées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires. Dans celles-ci, les cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire constituée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de muco-polysaccharides.

I.2.3- L'adventice

C'est l'enveloppe par laquelle le vaisseau s'amarre aux structures de voisinage, elle est constituée de :

- Un tissu conjonctif peu organisé : riche en collagène et en fibres élastiques et contenant des fibroblastes et des adipocytes.

- Une enveloppe : qui assure l'ancrage du vaisseau aux structures avoisinantes.

- Des vasa vasorum : petits vaisseaux sanguins qui irriguent l'adventice et ne pénètrent dans la média que quand le nombre de couches de cellules musculaires lisses est important.

- Un réseau de nerfs vasomoteurs : qui rejoint les fibres musculaires lisses de la media. (Rushmer et al., 1979).

II- Fonction des cellules vasculaires

II.1 – L'endothélium : Les CE

II.1.1- Structure et propriétés de la CE

Les CE sont polarisées, leur paroi basale est ancrée sur la matrice extracellulaire composée de macromolécules de nature collagénique et de protéines adhésives (collagène, fibronectine, facteur von Willebrand). Leur face vasculaire est en contact avec le sang circulant et représente une surface non thrombogène du fait de son organisation et de la production par les cellules des substances anticoagulantes et antiagrégantes plaquettaires. Elles ont une forme aplatie (0,1-1 µm) polygonale de quelques micromètres d'épaisseur, 10-15µm de largeur et 20-50µm de longueur orientées dans la direction du flux sanguin (Legrand et al., 1987 ; Chappey et al., 1997). L'intégrité endothéliale est assurée par des systèmes d'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice. Les protéines de la matrice extracellulaire interagissent avec des récepteurs de la famille des intégrines présents sur la surface endothéliale. L'adhérence entre cellules est contrôlée par des molécules d'adhésion (intégrines, cadhérines, PECAM-1-*Platelet endothelial cell adhesive molecule-1*).

Il existe également à la surface des CE des canaux ioniques, des pores et des vésicules trans-cellulaires. Leur membrane est recouverte de charges négatives riches en carbohydrates (protéoglycanes). Parmi les constituants intracellulaires, on remarque la présence de corps de Weibel-Palade (WP), des organelles cytoplasmiques contenant le facteur von Willebrand (vWF), molécules spécifiques des CE (Ruggeri et al., 1993). Les corps de Weibel-Palade se présentent sous la forme de bâtonnets résultant de la juxtaposition de petits tubules orientés parallèlement à l'axe longitudinal et entourés d'une structure membranaire (figure 2). Ces tubules représentent probablement les multimères de vWF (Legrand et al., 1987 ; Ruggeri et al., 1993 ; Chappey et al., 1997).

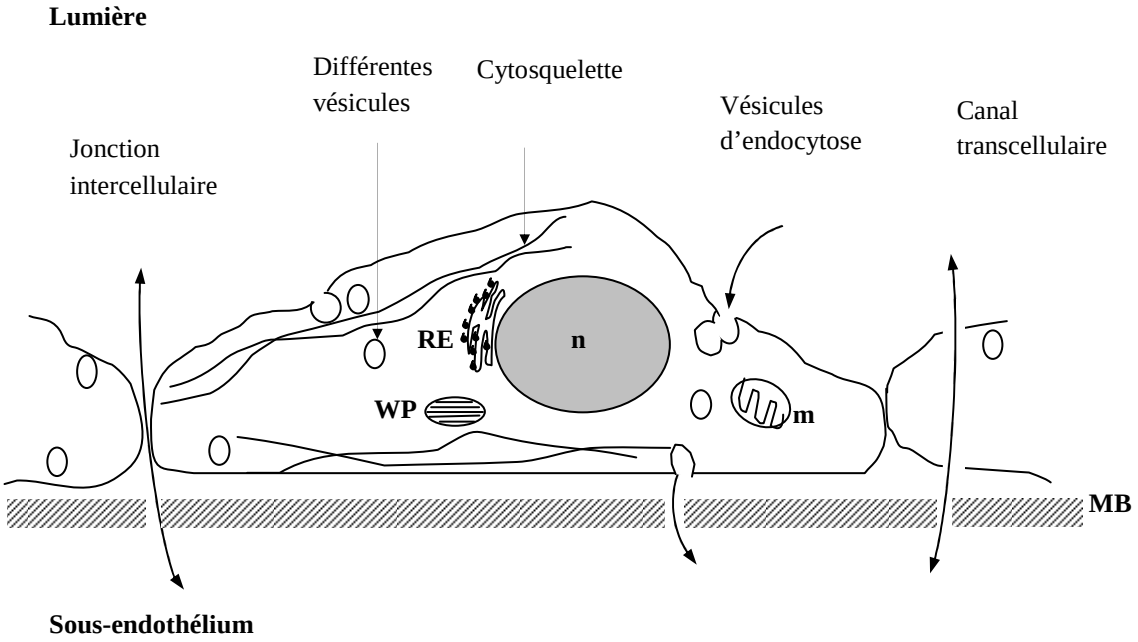


Figure 2 : Représentation schématique de la cellule endothéliale. m : mitochondrie ; n : noyau ; MB : membrane basale ; RE : réticulum endoplasmique ; WP : corps de Weibel Palade. (d'après Legrand et al., 1987).

II.1.2- Fonctions de la CE

Les CE interviennent dans la défense immunitaire par leurs fonctions biologiques, en particulier dans la recirculation lymphocytaire et le recrutement des leucocytes circulant lors des états inflammatoires (Springer et al., 1994). Cependant, quatre aspects de la physiologie endothéliale sont importants à considérer (Stoltz et al., 1999 « 1 »).

a) Barrière de perméabilité sélective

Les CE constituent une barrière de perméabilité sélective qui permet et régule les échanges de molécules de tailles variables (eau, sels, protéines, ions, molécules pharmacologiques) entre le sang et les tissus. Les voies de transport au travers de la barrière endothéliale varient selon leur localisation artérielle, veineuse ou microcirculatoire. Les jonctions cellules/cellules et les vésicules de transport sont principalement empruntées.

Les échanges avec la lumière du vaisseau peuvent se faire de nombreuses façons :

- ✓ Par diffusion passive (gaz, ions,…),
- ✓ Par transport intracellulaire par pinocytose (protéines, lipides),
- ✓ Par le biais de transporteurs membranaires (facteurs de croissance),
- ✓ Au travers de l'espace intercellulaire permettant le passage des cellules du sang lors de phénomènes inflammatoires par exemple (diapédèse).

b) Action anti-thrombosante et thrombosante

La surface luminale de la CE est thromborésistante, alors que la surface abluminale adhère fortement aux macromolécules thrombogènes du sous-endothélium qu'elle synthétise. Les CE expriment à leur surface des protéoglycanes (glycoaminoglycanes sulfatés) à charges négatives. Elles secrètent aussi l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'inhibiteur du facteur tissulaire. La thromborésistance de l'endothélium est le résultat de propriétés actives et passives des CE, qui empêchent l'activation du système de la coagulation permettant la génération de thrombine ainsi que l'adhésion et l'activation des plaquettes à l'interface.

Les CE expriment une glycoprotéine transmembranaire : la thrombomoduline, récepteur de la thrombine. Cette protéine constitue alors un complexe qui active la protéine C. Cette action anticoagulante maîtrise la génération constante de thrombine à l'interface du sous-endothélium et des cellules sanguines. La thromborésistance endothéliale dépend donc principalement de la modulation de la thrombine, des fonctions plaquettaires et de l'induction de propriétés biologiques de l'endothélium. L'endothélium exerce des activités anticoagulantes par d'autres voies telles que la captation et la dégradation de substances thrombogènes (ADP, 5-HTP) et par l'effet des produits vasomoteurs (Prostacycline « PGI_2 », oxyde nitrique (NO), …) sur les plaquettes.

c) Action vasomotrice

La CE synthétise des agents vasoactifs tels que l'endothéline-1 (ET-1), PGI_2 ou NO (Stoltz et al., 1999 « 2 »). Elle possède des enzymes qui inactivent la bradykinine et transforment l'angiotensine I en angiotensine II vasoactif, et est également la source de certains facteurs de croissance.

d) Propriétés anti-adhésive et adhésive

La CE exprime à sa surface vasculaire de façon constitutive ou après induction biochimique ou mécanique, des récepteurs d'adhésion pour les leucocytes polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes.

Les trois familles de molécules d'adhésion qui interviennent principalement dans les processus d'adhésion leucocytaire sont : les sélectines, les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines (Carlos et al., 1994 ; Springer et al., 1994 ; Tedder et al., 1995 ; Aplin et al., 1998).

Les sélectines, interviennent principalement dans les interactions entre les leucocytes circulants et les CE durant la capture et l'étape de roulement du mécanisme d'adhésion lors des processus inflammatoires. Elles reconnaissent les carbohydrates fucosylés. Ces interactions labiles permettent ainsi aux leucocytes de rouler le long de l'endothélium vasculaire dans la direction du flux sanguin.

Les intégrines, sont des glycoprotéines transmembranaires qui se trouvent de manière prédominante à la surface des leucocytes et des CE ; elles sont liées au cytosquelette et lui communiquent les signaux extracellulaires. Elles sont impliquées dans les phénomènes de mécanotransduction.

La superfamille des immunoglobulines, représente la famille la plus abondante des molécules de la surface cellulaire. Leur structure est caractérisée par des domaines répétitifs semblables à ceux trouvés sur les immunoglobulines. Bien que « le roulement » (phénomène dit de *Rolling*) des leucocytes sur les CE soit un pré-requis pour une adhérence ferme sur la paroi vasculaire, l'adhésion des leucocytes *via* les sélectines ne permet pas une adhésion réelle, à moins que des molécules de la superfamille des immunoglobulines n'interagissent. Pour les interactions cellules endothéliales/leucocytes, les membres les plus importants de cette famille sont : ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1, qui servent de ligand pour les intégrines LFA-1 et VLA-4.

II.2- La cellule musculaire lisse (CML)

II.2.1- Structure des CML

Les CML sont des cellules peu différenciées issues du mésoderme. Ce sont des cellules allongées de 2-5 µm de diamètre pour une longueur très variable selon le tissu (de 15 µm pour les plus petites à 500 µm pour les CML utérines). *In vivo*, les cellules sont organisées en feuillet et sont parallèles. Elles sont associées entre elles par un tissu conjonctif renfermant essentiellement du collagène et de l'élastine. Tout comme les cellules musculaires

squelettiques et cardiaques, les CML contiennent des myofilaments fins d'actine et des myofilaments épais de myosine. Toutefois, ces filaments ne sont pas organisés et ne forment pas de myofibrilles bien individualisées ; ils sont groupés en faisceaux irréguliers orientés selon le grand axe de la cellule. La membrane plasmique des CML présente des jonctions qui permettent la diffusion rapide de messages, et notamment de l'excitation d'une cellule à l'autre.

II.2.2- Fonctions des CML

Les cellules musculaires lisses ont un rôle essentiel dans le système vasculaire. Ce sont les principaux éléments contractiles des parois des vaisseaux sanguins. Elles ont la propriété de produire et de sécréter diverses protéines comme le collagène et l'élastine qui vont s'insérer dans leur membrane basale ou être excrétées dans la matrice extracellulaire. Leur fonction contractile assure la vasomotricité et le tonus artériel. La vasomotricité est régulée par les messagers agissant sur l'endothélium qui transmet l'ordre aux CML par l'intermédiaire d'un second messager. En outre, les CML assurent des fonctions métaboliques, en particulier le catabolisme des lipoprotéines LDL.

III- La circulation sanguine

De nombreuses études physiologiques et pathologiques ont été réalisées sur l'écoulement du sang dans le système vasculaire, dans le but d'élucider les complications observées au cours de pathologies cardiovasculaires. L'écoulement du sang au sein de l'organisme est engendré par des actions mécaniques diverses, reposant sur :

- Les forces créées par les contractions périodiques du cœur.

- Les forces restituées par le comportement élastique des artères, à l'issue de leur remplissage par la contraction du cœur.

- La compression des vaisseaux sanguins au cours de mouvements corporels.

- Les contractions péristaltiques des muscles lisses entourant certains vaisseaux sanguins.

Comme nous l'avons déjà indiqué, les contractions du cœur engendrent l'écoulement du sang dans les vaisseaux (artères, capillaires et veines). Avant d'examiner en détail les

propriétés des vaisseaux, il est nécessaire de définir les modalités d'écoulement du sang et les relations qui existent entre la pression et le débit à l'intérieur de l'appareil circulatoire.

Chez les vertébrés, le sang passe d'une portion de l'appareil vasculaire à une autre. Comme les liquides sont incompressibles, le sang éjecté hors du cœur entraîne le déplacement d'un volume de sang équivalent, tout au long du circuit vasculaire ; en d'autres termes, la même quantité de sang passe, par minute, dans l'ensemble des artères des capillaires et des veines d'un circuit vasculaire quelconque. Dans la mesure où le volume sanguin total de l'organisme ne varie pas, une diminution du volume sanguin contenu dans une partie de l'appareil circulatoire s'accompagne nécessairement d'une augmentation équivalente du volume sanguin d'une autre partie de l'appareil.

Le débit sanguin en un endroit donné ne dépend pas de la distance qui le sépare du cœur, mais principalement de la surface de la section totale du circuit sanguin à l'endroit considéré (c'est-à-dire, de la surface de section de l'ensemble des capillaires ou des artères qui constituent la portion considérée). De la même façon que la vitesse de l'eau d'une rivière augmente dans les parties étroites de son cours, la vitesse du sang atteint les valeurs maximales là où la surface de section totale est minimale (les vitesses les plus faibles se rencontrant dans les portions de large section). Ce sont les artères qui ont les plus faibles surfaces de section totale, tandis que les capillaires ont les plus grandes surfaces de section. Ainsi les vitesses d'écoulement sanguin les plus élevées se rencontrent dans l'aorte et dans les artères pulmonaires ; la vitesse d'écoulement chute ensuite considérablement lorsque le sang traverse les capillaires, puis augmente à nouveau lorsque le sang passe dans les veines. La faible vitesse d'écoulement dans les capillaires est une caractéristique importante, du point de vue fonctionnel, car elle permet les échanges de substances, très lents, entre le sang et les tissus.

III.1- La pression sanguine

La pression sanguine est le résultat de la pression imposée par le cœur sur le sang en le poussant et de la résistance de la paroi élastique des vaisseaux. Elle est également appelée « tension artérielle », les valeurs de pression sanguine artérielle rapportées dans la littérature étant généralement des valeurs de pressions transmurales (c'est-à-dire des différences entre la pression interne et la pression externe, qui s'exerce de part et d'autre de la paroi d'un

vaisseau). A l'extérieur des vaisseaux, la pression est généralement voisine de la pression ambiante mais des variations locales de la pression extravasculaire, dans certains tissus, peuvent modifier considérablement la pression transmurale et par conséquent le diamètre des vaisseaux, ce qui retentit sur le débit sanguin.

III.2- Les composantes hémodynamiques de la pression sanguine

Le système artériel est élastique et résistif. Le sang est propulsé par le ventricule avec une énergie initiale élevée. A l'étage artériolaire, il existe une forte résistance à l'écoulement sanguin. La caractéristique majeure de la pression artérielle est d'être pulsatile entre une pression maximale (systolique), la pression provoquée par l'onde pulsatile, elle-même engendrée par la contraction (systole) ventriculaire gauche, et une pression minimale (diastolique), correspondant à la pression résiduelle dans les artères avant une nouvelle onde systolique. Cette phase est caractérisée par la relaxation du cœur, au cours de laquelle il se relâche pour se remplir à nouveau.

La pression peut également être définie à partir d'une valeur moyenne (pression artérielle moyenne), autour de laquelle s'établissent des oscillations. Il est ainsi possible d'évaluer un débit continu (lié à la pression artérielle moyenne), prédominant dans les artérioles et les capillaires, et un débit pulsatile, prédominant dans l'aorte et les grosses artères.

III.2.1- Niveau de la pression artérielle systolique

Ce niveau est déterminé par la pression artérielle moyenne et par trois facteurs indépendants : le volume d'éjection systolique, la force contractile du ventricule gauche et la vitesse de propagation de l'onde de pression le long du système artériel. Cette dernière dépend directement de la rigidité de la paroi des grands troncs artériels : plus celle-ci est rigide, plus elle propage rapidement l'onde de pouls ; schématiquement donc, plus la paroi artérielle est rigide, plus la pression systolique est élevée. En pratique clinique, cette rigidité artérielle s'apprécie par son inverse, la compliance. Celle-ci est égale au rapport de la variation de volume, liée à la distance de la paroi artérielle lors du passage de l'onde systolique, et la variation de pression simultanée : $C = \Delta V/\Delta P$. La compliance est donc la pente de la droite de régression volume/pression.

III.2.2- Niveau de la pression artérielle diastolique

Il dépend également de la pression artérielle moyenne, mais aussi de deux autres facteurs propres indépendants : la vitesse de décroissance de la pression artérielle et la compliance artérielle qui est responsable, au cours de la diastole, de la contraction des grosses artères distendues au cours de la systole par l'éjection ventriculaire gauche. Plus la compliance est réduite, plus la diastolique est basse.

La compliance artérielle a un rôle déterminant, puisqu'elle affecte à la fois et de façon opposée les pressions diastoliques et systoliques. En effet, pour une même pression moyenne, lorsque la compliance est réduite, la pression systolique est plus élevée et la diastolique est plus basse. Ceci correspond à une plus grande pression différentielle et donc à une pulsatilité artérielle plus importante, responsable de modifications structurales réversibles puis irréversibles. Cette plus grande pulsatilité est donc *a priori* néfaste pour les vaisseaux (Eckert et al., 1999).

IV- La régulation de la TA

Elle a pour but de maintenir une pression la plus constante possible à l'intérieur du vaisseau. Elle se déroule soit en modulant le volume sanguin (régulation par la volémie), soit en modulant le diamètre du vaisseau (régulation par vasomotricité). Dans cette étude, la régulation que nous avons entrepris d'étudier est la régulation par la vasomotricité.

IV. 1- La régulation par la vasomotricité

La vasomotricité est l'élément essentiel de la régulation des résistances périphériques. C'est la capacité d'un vaisseau à modifier son calibre et donc la résistance ou l'adaptation aux conditions physiologiques et pathologiques (réglage du débit). La vasomotricité est différente selon le type de vaisseau (artère ou veine) et selon le type de l'artère ; elle est régulée à deux niveaux : un premier niveau intrinsèque, l'autorégulation, et un second niveau extrinsèque de nature neurohormonale. L'autorégulation locale du tonus vasculaire permet le contrôle des débits sanguins locaux en fonction des conditions métaboliques locales et/ou des variations de la pression de perfusion tissulaire. La régulation extrinsèque des résistances artériolaires

dépend de l'activation de récepteurs et s'établit par l'intermédiaire de nombreux neuromédiateurs ou de substances hormonales systémiques ou locales.

Avant d'envisager ces différents récepteurs, un bref rappel des mécanismes intracellulaires contrôlant la contraction et la relaxation de la fibre musculaire lisse sera fait.

IV.1.1- Contraction et relaxation de la fibre musculaire

Les phénomènes de relaxation et de contraction de la fibre musculaire lisse vasculaire dépendent des modifications de la concentration du Ca^{+2} libre dans la cellule. Dans la cellule au repos, sa concentration est faible, de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} M. La contraction de la fibre vasculaire apparaît dès que cette concentration dépasse 10^{-7} M. Tous les phénomènes qui provoquent la contraction agissent en augmentant la concentration de Ca^{+2} libre, alors que ceux qui aboutissent à la relaxation la diminuent. L'augmentation du Ca^{+2} libre peut résulter à la fois d'une entrée du Ca^{+2} extracellulaire et d'une libération du Ca^{+2} intracellulaire dans ces sites de stockage.

Lorsque la concentration de Ca^{+2} intracellulaire augmente, il se fixe sur une calciprotéine, la calmoduline. Le complexe Ca^{+2}/calmoduline qui correspond à la forme active de la calmoduline, active à son tour la myosine kinase. La forme ainsi activée de la kinase permet la phosphorylation des chaînes légères de myosine. La myosine ainsi phosphorylée, peut interagir avec les fibres d'actine et provoquer la contraction de la fibre lisse vasculaire. Ce phénomène est réversible sous l'effet d'une phosphatase de la myosine qui est une enzyme spontanément active.

Régulation du Ca^{+2} intracellulaire

L'entrée du Ca^{+2} dans la cellule n'est possible que lorsque les canaux calciques, qui seuls permettent le passage du Ca^{+2} du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, s'ouvrent. L'ouverture de ces canaux est contrôlée par divers stimuli dynamiques (cisaillement, étirement,…), biochimiques (bradykinine, œstradiol, sérotonine et histamine) ou pharmacologiques (médicaments dirigés contre l'hypertension artérielle tels que les β bloquants) (Goetz et al., 1999 ; Gosink et al., 1993 ; Kelm et al., 1993). À l'extérieur de la cellule, la Ca^{+2} est à une concentration relativement élevée (2,5 mM) dont le tiers environ est lié à des protéines (sérumalbumine), la concentration est également élevée dans les citernes du réticulum endoplasmique (RE) et les autres organites intracellulaires où le Ca^{+2} est lié à diverses protéines (qualséquestrine, calréticuline, endoplasmine). Dans le cytoplasme, au

contraire, la concentration du Ca^{+2} peut atteindre jusqu'à 0,15 µM, mais elle peut s'élever rapidement (10 µM), ce qui constitue le signal Ca^{+2}. Les réserves de Ca^{+2} dans le RE sont libérées grâce à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3, *second messager, qui résulte de l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire, le phosphatidyl-inositol-diphosphate « PIP2 », par la phospholipase C,* interagit avec les récepteurs de la membrane du RE qui font fonction de canaux calciques. Il en est de même des canaux calciques de la membrane plasmique qui s'ouvrent pour laisser entrer le Ca^{+2} dans la cellule. Lors de l'arrêt du signal Ca^{+2}, les canaux calciques se referment suite à l'hydrolyse de l'ATP pour fournir de l'énergie (figure 3) (Tiruppathi et al., 2006 ; http://www.chups.jussieu.fr).

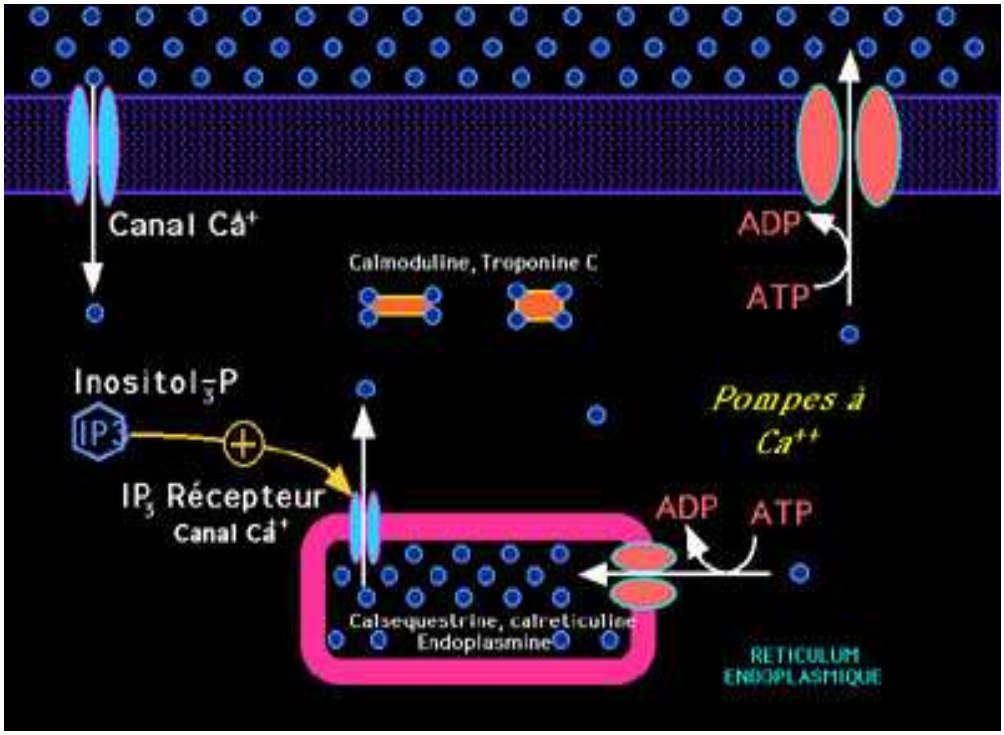


Figure 3 : régulation du Ca^{+2} intracellulaire. La concentration du Ca^{+2} est élevée dans le milieu extracellulaire et dans le réticulum endoplasmique. En revanche, elle est faible dans le cytoplasme, mais elle peut augmenter en réponse à une stimulation via l'ouverture des canaux calciques qui est régulée par l'IP3 et l'ATP (http://www.chups.jussieu.fr).

IV.1.2- Vasomotricité endothélium dépendante

L'endothélium joue un rôle très important dans la régulation de la circulation sanguine. Les cellules endothéliales (CE) synthétisent des composants qui permettent le maintien de l'équilibre vasomoteur ; ce sont : **l'endothéline** (vasoconstricteur) et **la prostacycline, l'oxyde nitrique** (vasodilatateurs), dont le rôle est de maintenir le tonus vasculaire (équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation) (Cohen et al., 2007).

Dans la partie suivante de cette introduction bibliographique, nous allons approfondir les données sur une molécule vasoactive, l'oxyde nitrique. En effet, notre étude se focalise essentiellement sur le rôle de cette molécule dans le maintien du tonus vasculaire ainsi que sur les mécanismes cellulaires régulant sa production, mécanismes qui peuvent être déclenchés par divers stimuli biochimiques, mécaniques ou pharmacologiques. En dernière partie, nous entreprendrons l'étude de l'effet d'une stimulation pharmacologique sur les mécanismes de régulation de la production de l'oxyde nitrique.

V- L'oxyde nitrique (NO)

NO est une molécule ubiquitaire principalement produite par la CE et qui joue un rôle fondamental dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. Il est ainsi impliqué dans les modifications du tonus vasculaire au cours de l'hypertension, de l'athérosclérose, du choc septique, de la vasoconstriction hypoxique ainsi qu'au cours des lésions inflammatoires rénales. Etant de nature lipidique, NO peut diffuser de la CE vers la CML à travers les membranes cellulaires et induire une relaxation du muscle lisse entraînant ainsi une vasodilatation et donc une baisse de la tension à l'intérieur du vaisseau (Kone et al., 2000 ; Alderton et al., 2001).

V.1- Voies de synthèse et action

NO est le produit d'une réaction enzymatique catalysée par une enzyme appelée la NO synthase (NOS). La NOS utilise comme substrat l'acide aminé L-arginine, l'oxygène et le NADPH. Les produits de cette réaction sont la L-citrulline et NO. Après sa synthèse, NO se fixe aux hémoprotéines comme l'hémoglobine pour être réduit en nitrates ; il se fixe également sur de nombreuses enzymes héminiques ; la cyclo-oxygénase qu'il active, la eNOS elle-même qu'il inhibe, et sur les métalloenzymes fer-soufre de la respiration mitochondriale qu'il inhibe aussi. NO se fixe également sur le groupement héminique de la guanylate cyclase soluble (GC) qu'il active en augmentant la production intracellulaire de GMPc. La GMPc active à son tour une protéine-kinase GMPc-dépendante qui va activer les canaux potassiques et donc induire une hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse vasculaire (Klinger et al., 2007).

Trois isoformes de NOS hautement homologues dans leur structure primaire ont été identifiées :

* nNOS (ou NOS1) : exclusivement exprimée dans les neurones.

* eNOS (ou NOS3) : exprimée dans les CE, les cardiomyocytes et les plaquettes.

Ces deux isoformes sont d'expression constitutive dans la cellule.

* iNOS (ou NOS2) : qui n'est pas constitutive mais peut être induite par diverses cytokines en cas de processus inflammatoire (TNFα, LPS, $IL_1\beta$,…) (Alderton et al., 2001).

<u>Structure de la eNOS</u>

La eNOS est constituée de deux domaines : un domaine oxygénase N terminal qui contient les sites de fixation de l'hème, BH4 (la tétrahydrobioptérine) et la L-arginine, et un domaine réductase C terminal qui contient les sites de fixation de la calmoduline ainsi que les cofacteurs FAD (flavine adénine dinucléotide), FMN (flavine mononucléotide) et NADPH. Isolés, les deux monomères sont inactifs et sont incapables de fixer le substrat ou les cofacteurs, mais leur assemblage conduit à la formation d'un dimère actif par le biais du cofacteur BH4 (Fleming et al., 1999 ; Alderton et al., 2001) (figure 4).

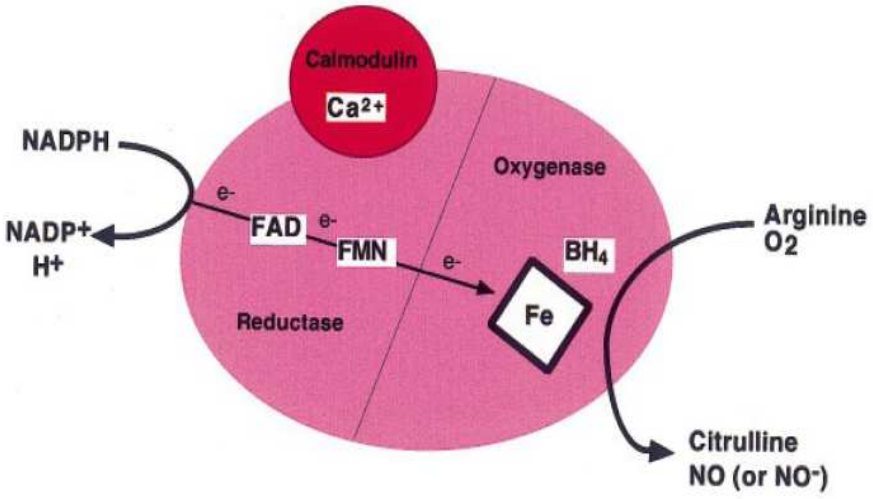


Figure 4 : schéma des domaines constituant la eNOS et des cofacteurs impliqués dans son activité enzymatique (Alderton et al., 2001)

La eNOS produit NO au cours d'une étape d'oxydation de cinq électrons via la formation d'un intermédiaire N^G-hydroxy-L-arginine. Pour cela, l'enzyme requiert la présence de cofacteurs comme BH4, FAD et FMN. La variation de la concentration de ces cofacteurs influence la réaction enzymatique qui peut se terminer soit par la production de NO, soit par la production de superoxyde (Fleming et al., 1999). L'expression et l'activité de la eNOS sont modulées par différents éléments biochimiques ou mécaniques qui influencent sa localisation intracellulaire, sa phosphorylation et plusieurs interactions protéine-protéine. Ces points vont être expliqués dans la suite de cette étude bibliographique. Ces conditions sont bien sûr hautement liées au type cellulaire et nécessitent une régulation par des mécanismes complexes.

V.2- Facteurs influençant la production de NO

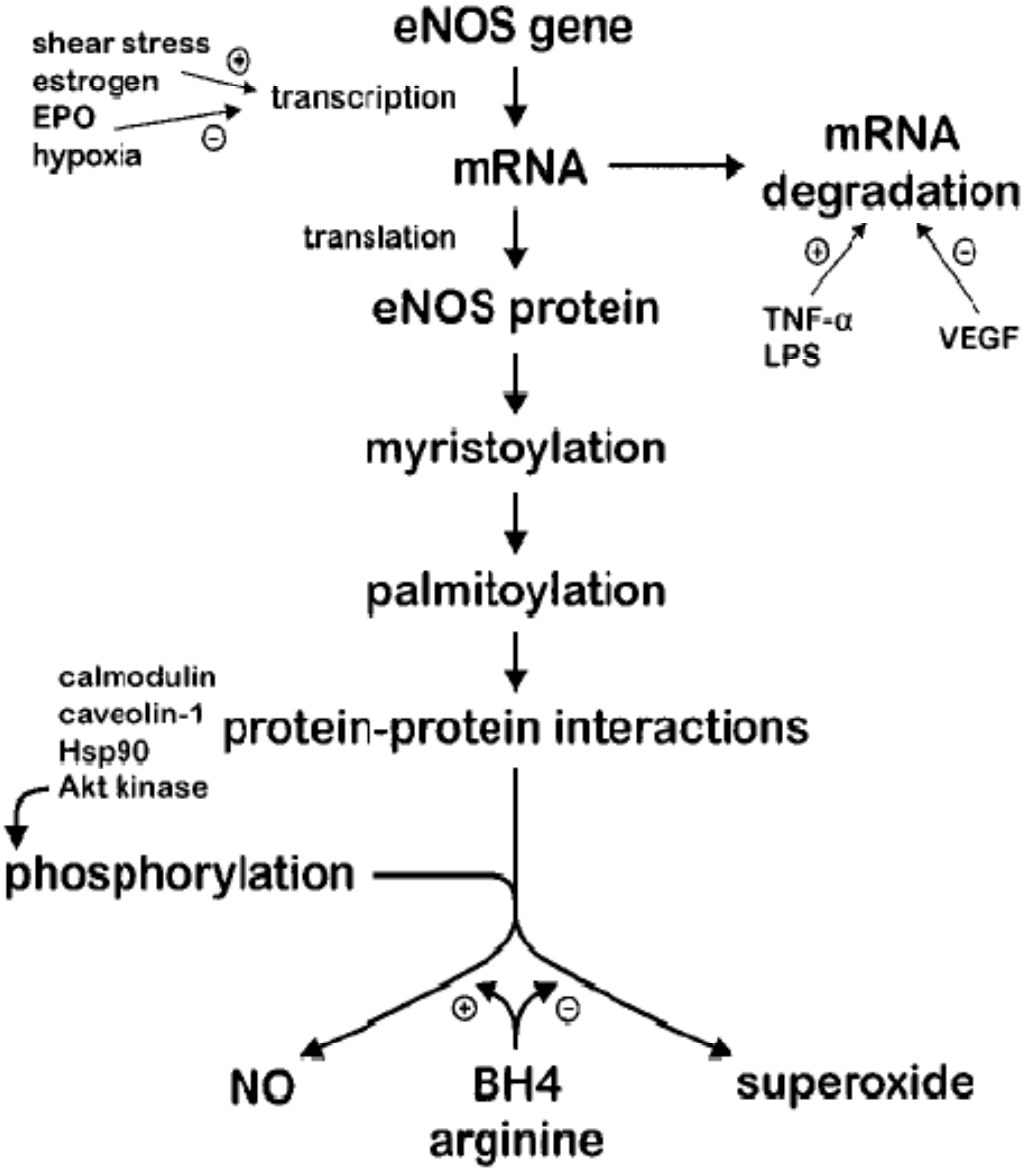
La principale voie de synthèse de NO dans les CE est la réaction enzymatique catalysée par la eNOS. Ainsi, la production de NO dépend du taux d'expression et de l'activité de cette enzyme. D'une manière générale, l'expression d'une enzyme est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (cinétique de **transcription**, **stabilité**, **maturation** et **traduction** des ARNm). La plupart des protéines sont synthétisées sous forme inactive, leur activation nécessitant des modifications post-translationnelles sous l'influence d'autres protéines (Su et al., 2003).

Dans la CE, la eNOS peut être activée en réponse à plusieurs stimuli biochimiques (bradykinine « BK », acétylcholine, insuline, vascular endothelial growth factor (VEGF), angiotensine « Ang II », ATP,…) ou mécaniques (forces de cisaillement) (Marrero et al., 1999).

V.2.1- Régulation de la transcription de la eNOS

L'expression de la eNOS est régulée par divers stimuli. Son expression basale dépend en premier lieu du type tissulaire : elle est abondamment exprimée dans les CE. Le niveau basal d'expression de la eNOS peut être modulé par plusieurs facteurs ; il a été rapporté que l'expression de la eNOS augmente en réponse aux forces mécaniques (cisaillement sanguin ou étirement cyclique) (Uematsu et al., 1995 ; Wedgwood et al., 2001, 2003 ; Tao et al., 2006). Il est également modulé par des facteurs biochimiques comme la lysophosphatidylcholine (lysoPC), les immunosuppresseurs tels que la cyclosporine A, les inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC), le peroxyde d'hydrogène, les œstrogènes, le VEGF, l'epidermal growth factor (EGF), le transforming growth factor-β (TGF-β) et de faibles concentrations de LDL oxydé. Ces différents facteurs auraient un effet positif sur la stabilisation des ARNm de la eNOS.

Les facteurs connus pour réduire l'expression de la eNOS suite à la déstabilisation des ARNm sont : le tumor necrosis factor-α (TNF-α), les lipopolysaccharides (LPS), l'érythropoïétine, l'hypoxie et les fortes concentrations de LDL oxydé (figure 5). D'autre part, NO constitue en lui-même un régulateur de l'expression de la eNOS ; il a été rapporté que NO était impliqué dans un mécanisme de feed-back négatif et diminuait de ce fait l'expression de la eNOS via un mécanisme dépendant de la cGMP (Govers et al., 2001 ; Li et al., 2002).



<u>Figure 5 :</u> schéma présentant les différents éléments impliqués dans la régulation de la eNOS commençant par les facteurs influençant sa transcription (cisaillement, œstrogènes, hypoxie) puis la traduction des ARNm (TNF*α*, LPS, VEGF) et enfin son activation, qui est essentiellement régulée par des interactions avec d'autres protéines (calmoduline, cavéolines1, HSP et Akt). (d'après Govers et al., 2001)

V.2.2- Régulation co-translationnelle de la eNOS

Myristoylation : elle consiste en la liaison de l'acide myristique au résidu glycine N terminal de certaines protéines par une liaison amide afin de leur permettre de s'ancrer à la membrane cytoplasmique. La eNOS est la seule isoforme des NOS qui renferme au cœur de sa structure un groupe myristoyle. La iNOS et la nNOS étant de localisation cytoplasmique, elles ne renferment pas ce groupe (Govers et al., 2001). Lorsque la eNOS est ancrée dans la membrane cytoplasmique, elle est dite péri-membranaire. Cette localisation est un facteur très important pour son activation. De nombreux auteurs ont rapporté que l'activation de la eNOS dépendait en premier lieu de sa localisation intracellulaire. Cette dernière peut être péri-membranaire (dans les cavéolae), péri-nucléaire ou ancrée à la membrane de l'appareil de Golgi (Su et al., 2003).

V.2.3- Régulation post translationnelle

La protéine naissante (directement issue de la traduction de l'ARNm) n'est pas fonctionnelle. Pour l'être, elle doit prendre une structure tridimensionnelle particulière. La structure active dépend bien sûr de la configuration initiale, mais aussi de nombreuses réactions enzymatiques conduisant à l'établissement de liaisons covalentes au sein de la structure elle-même (ponts disulfures, glycosylation, acétylation, prénylation) ou à la rupture de liaisons covalentes (hydrolyse). Par ailleurs, sa structure dépend de l'intervention de protéines chaperons comme les protéines du choc thermique (HSP).

Palmitoylation (acylation) : elle consiste en l'ajout d'un acide palmitique (acide gras saturé en C16) via une liaison thioester sur une cystéine interne de la protéine. Elle est catalysée par les palmitoyltransférases. Au niveau fonctionnel, la palmitoylation intervient dans la localisation de la eNOS en stabilisant sa liaison à la membrane plasmique. La eNOS est palmitoylée sur deux résidus de cystéine situés à proximité de l'extrémité N terminale. Cette modification est réversible et requiert préalablement la myristoylation de l'enzyme. La dépalmitoylation de la eNOS est assurée par une enzyme cytosolique, la protéine-acyl-thioestérase, et requiert la présence du complexe Ca^{+2}/calmoduline. Des études ont prouvé qu'une mutation dans le site de palmitoylation de la eNOS entraîne une diminution de la production de NO, ce qui indique que l'activité de l'enzyme est fortement dépendante de sa localisation intracellulaire (Govers et al., 2001). Dans la partie suivante, nous allons étudier plus en détail la relation entre la localisation intracellulaire de la eNOS et son activité.

V.3- Localisation et activation de la eNOS

V.3.1- Localisation de la eNOS dans les caveolae et interaction avec la cavéoline-1

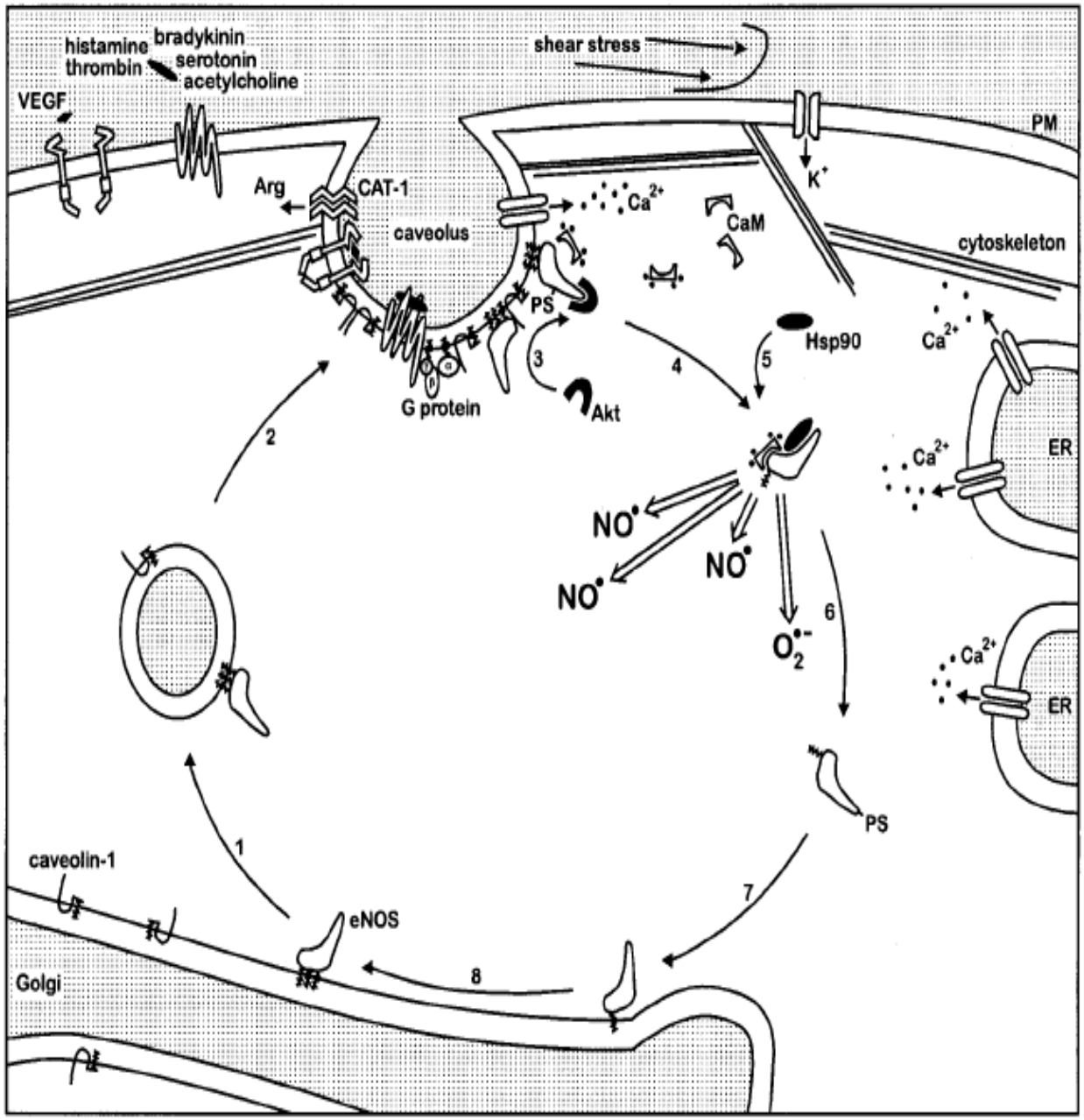
Les caveolae sont des invaginations dans la membrane plasmique présentes dans la plupart des types cellulaires (Sun et al., 2002). Elles sont abondamment présentes dans les CE, les adipocytes, les fibroblastes et les CMLs. Il a été rapporté que ces structures renferment et contrôlent de nombreuses molécules de signalisation telles que les récepteurs tyrosine kinase, les protéines G et, entre autres, la eNOS (Anderson et al., 1993 ; Lisanti et al., 1994 ; Zharikov et al., 2000). La membrane des caveolae est constituée de cholestérol, de glycosphingolipides et de protéines structurales telles que les cavéolines-1, 2 et 3. Dans les caveolae, la eNOS est présente sous une forme inactive qui est due à une interaction de l'enzyme avec la cavéoline-1 au niveau du domaine de fixation du complexe Ca^{+2}/calmoduline (Fleming et al., 1999, Su et al., 2003 ; Govers et al., 2001). La cavéoline-1 est d'ailleurs une protéine irréversiblement palmitoylée ancrée en permanence dans la membrane des cavéolae (Smart et al., 1999) et son interaction avec la eNOS permet de maintenir celle-ci au niveau de la membrane et empêche sa translocation. L'interaction cavéoline-1/eNOS est maintenue tant que la concentration cytosolique du Ca^{+2} est faible (Kone et al., 2000). Ainsi la cavéoline-1 constitue un régulateur négatif de l'activation de la eNOS (Feron et al., 1999).

La membrane des caveolae renferme également des éléments essentiels à la fonction de la eNOS tels que la pompe Ca^{+2}, les récepteurs œstrogène et VEGF ainsi que CAT-1 (cationic amino acid transporter) qui est le transporteur de la L-arginine à travers la membrane plasmique et le cofacteur BH4.

V.3.2- localisation de la eNOS dans l'appareil de Golgi

En plus de sa localisation membranaire dans les caveolae, la eNOS est également retrouvée ancrée dans la membrane de l'appareil de Golgi (Fulton et al., 2002 ; Ortiz et al., 2004). Cette double localisation (caveolae et appareil de Golgi) serait requise pour son cycle d'activation, car des études ont démontré que l'altération de l'appareil de Golgi dans les CE, inhibe l'activité de la eNOS. Le cycle consiste en une repalmitoylation de la eNOS au niveau de l'appareil de Golgi après qu'elle a été dépalmitoylée au niveau des caveolae et transloquée dans la région péri-nucléaire où elle est phosphorylée et activée par les Akt, *protéine kinase B (PKB) connue pour son rôle dans les voies de signalisation chez les mammifères*. Ainsi, la

eNOS est recyclée en permanence entre les caveolae et l'appareil de Golgi via des vésicules de transport (figure 6) (Govers et al., 2001).



<u>Figure 6 :</u> cycle d'activation/désactivation de la eNOS. Dans les caveolae, la eNOS est palmitoylée, elle interagit avec la cavéoline 1 qui la maintient sous forme inactive. Lors d'une stimulation mécanique ou biochimique, ce complexe est rompu, et la eNOS est dépalmitoylée et transloquée dans le compartiment péri-nucléaire où elle est phosphorylée (activée) par la Akt après avoir fixé le complexe Ca^{+2}/calmoduline. La eNOs est ensuite repalmitoylée et se fixe sur la membrane de l'appareil de Golgi. Elle est enfin recyclée vers la membrane plasmique dans des vésicules membranaires. (d'après Govers et al., 2001).

L'activité de la eNOS dépend de sa localisation intracellulaire mais aussi de sa phosphorylation qui est un mécanisme post-translationnel important pour la régulation de diverses protéines (Michel et al., 1997).

V.4- Phosphorylation et translocation de la eNOS

V.4.1- phosphorylation :

La eNOS peut être phosphorylée sur les résidus sérine (Ser^{1177}, Ser^{114}) et thréonine (Thr^{495}), seule la phosphorylation de la Ser^{1177} induit l'activation de l'enzyme. Chez l'humain, la Ser phosphorylée (Ser^{1177}) existe dans le domaine réductase de l'enzyme, et la Thr (Thr^{495}) est située au niveau du domaine de fixation de la calmoduline. Dans une culture de CE, la Ser^{1177} est phosphorylée à la suite d'une stimulation par des forces de cisaillement, les estrogènes, le VEGF, l'insuline ou la bradykinine. Les kinases impliquées dans cette phosphorylation varient selon le type de la stimulation. Par exemple, lors de contraintes de cisaillement, la Ser^{1177} est phosphorylée suite à l'activation des Akt et PKA (protéine kinase A) (Dimmeler et al., 1999 ; Fisslthaler et al., 2000 ; Boo et al., 2002 ; Pott et al., 2006 ; Ladage et al., 2006). Les estrogènes, le VEGF et l'insuline phosphorylent la Ser^{1177} via la Akt. Quant à la bradykinine, elle phosphoryle la eNOS via la CaMKII (CaM-dependent kinase II) (Fleming et al., 2001). Dans tous les cas, la phosphorylation de la Ser^{1177} entraîne l'activation de l'enzyme et l'augmentation de la production du NO.

Le résidu Thr^{495} constitutivement phosphorylé, est considéré comme un site de régulation négative de l'enzyme, car sa phosphorylation entraîne la diminution de l'activité enzymatique. Ceci est dû à l'interférence de ce site avec le domaine de fixation de la calmoduline. Il a d'ailleurs été démontré que l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{+2} à la suite d'une stimulation par la bradykinine ou l'histamine, entraîne la fixation de la calmoduline sur la eNOS et la déphosphorylation de la Thr^{495} (Fleming et al., 2003). Les kinases impliquées dans la phosphorylation de la Thr^{495} sont les protéines kinases C (PKC) car leur inhibition augmente la production du NO (Michell et al., 2001). Sugimoto et al., (2007) ont rapporté que la Rho-kinase, que nous détaillerons ultérieurement, peut directement phosphoryler la eNOS sur la Thr^{495} et abaisser son activité. Ainsi, en plus de l'interaction de la eNOS avec la cavéoline-1 ou le complexe Ca^{+2}/calmoduline, son activation dépend aussi de la phosphorylation simultanée de la Ser^{1177} et de la Thr^{495}.

V.4.2- Translocation :

Comme il a déjà été mentionné, l'activité d'une protéine dépend fortement de sa localisation intracellulaire. Les monomères constituant la eNOS sont myristoylés et palmitoylés et par conséquent, ancrés dans la membrane des caveolae. Fleming et al., (2003) ont rapporté que cette localisation est requise pour la phosphorylation et l'activation de l'enzyme en réponse à des stimulations comme le VEGF, les estrogènes ou l'acétylcholine. Néanmoins, la eNOS a été détectée dans trois compartiments cellulaires : les caveolae, l'appareil de Golgi et le cytosol. A cette époque on ne savait pas encore si l'enzyme était soluble dans le cytosol ou si elle restait attachée à des fractions membranaires (vésicules membranaires) lors de sa translocation. Robinson et al., (1995) et Prabhakar et al., (1998) ont suggéré que la eNOS se détache de la membrane cavéolaire suite à une dépalmitoylation en réponse à des stimulations externes. Cette modification est favorisée par la fixation du complexe Ca^{+2}/calmoduline (Fulton et al., 2002 ; Sanchez et al., 2006 ; Pott et al., 2006). L'enzyme est ensuite phosphorylée par les Akt, puis transloquée dans le cytosol où elle est sous sa forme active, capable de produire NO. Puisque l'appareil de Golgi contient la palmitoyl-transférase, Govers et al., (2001), ont suggéré que la eNOS était probablement repalmitylée puis ancrée dans la membrane de l'appareil de Golgi, avant d'être recyclée vers la membrane plasmique via les vésicules de transport tel que le montre la figure 6, sachant que le même mode de transport a été décrit pour la cavéoline-1 par Kurzchalia et al., (1992).

V.5- Interaction de la eNOS avec le cytosquelette d'actine

V.5.1- Rappel de la structure du cytosquelette

Le cytosquelette est un complexe de filaments et tubules constitué de polymères biologiques et de protéines. Ces filaments sont présents dans toutes les cellules eucaryotes et sont classés selon leur diamètre en trois catégories : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

- les filaments d'actine (microfilaments) :

Les microfilaments sont constitués de monomères d'actine. Dans la cellule, l'actine est présente sous deux formes : des monomères globulaires (actine G) ou des polymères (actine F). L'état de polymérisation de l'actine étant l'un des thèmes majeurs de ce travail, nous

allons présenter les mécanismes cellulaires impliqués dans la formation des filaments ainsi que les protéines qui influencent leur stabilité.

Assemblage et structure des microfilaments

L'actine G se polymérise en présence d'ATP (lié à l'actine). Le filament formé, d'un diamètre de 7 à 9 nm, est une structure polaire qui contient une extrémité à croissance rapide (appelée +), où 1000 monomères peuvent être ajoutés par seconde, et une extrémité à croissance lente (appelée –). La polymérisation de l'actine G en filaments d'actine F est amorcée par l'ajout d'ions Mg^{2+}, K^{+} ou Na^{+}, selon un processus réversible, la F actine se dépolymérisant quand la force ionique baisse. Dans la cellule, il existe un équilibre dynamique entre la G actine et la F actine, le passage d'une forme à une autre est régulé par des protéines associées telles que la filamine et la fodrine qui sont activées en réponse à différents stimuli (figure 7) (http://www.ulisse.u-bordeaux.fr). Dans la CE, il existe une classe de protéines impliquées à la fois dans la régulation de l'assemblage des filaments d'actine et l'activité de la eNOS, ce sont les protéines Rho. Dans la partie suivante, nous allons expliquer ce double rôle des protéines Rho.

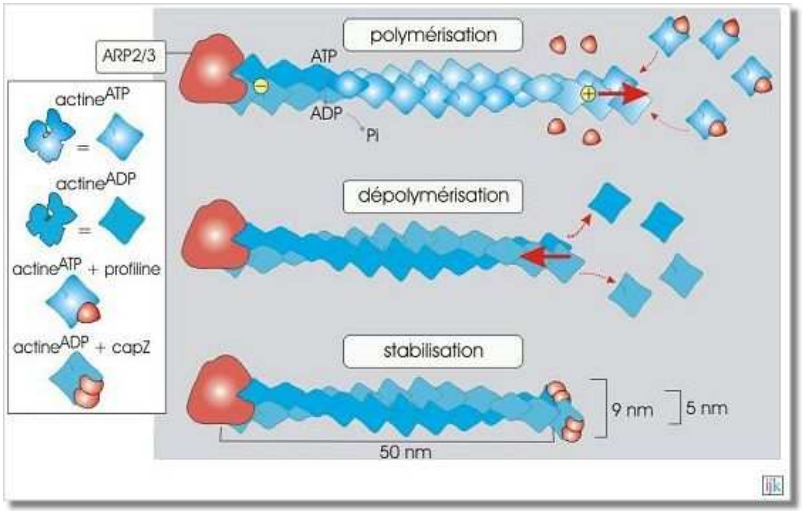


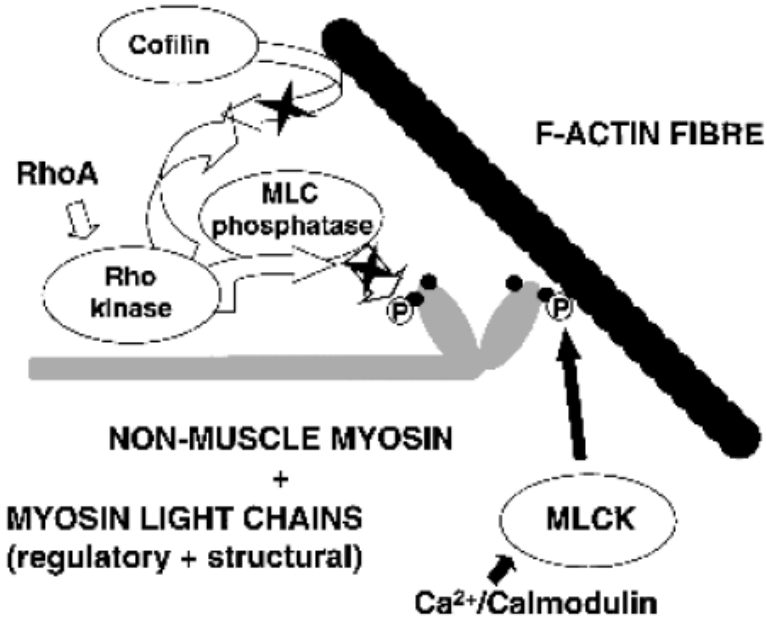
Figure 7 : mécanisme de polymérisation des filaments d'actine (http://www.ulisse.u-bordeaux.fr)

V.5.2- Double rôle de la Rho-kinase dans le réarrangement du cytosquelette d'actine et dans l'activité de la eNOS

Les protéines Rho appartiennent à la superfamille des petites GTPases Ras ; les plus connues sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Elles existent sous deux formes distinctes, l'une active, se liant au GTP, et l'autre inactive se liant au GDP. Les protéines Rho sont connues pour leur

rôle dans la réorganisation du cytosquelette : Cdc42 et Rac1 jouent respectivement un rôle dans la formation des filopodes et des lamellipodes, tandis que RhoA intervient essentiellement dans la formation des plaques d'adhésion et des fibres de stress (Nobes et al., 1995) et ce en ayant un rôle dans :

- L'activation de la Rho-kinase, qui stabilise la phosphorylation des chaînes légères de myosine (CLM). L'interaction des CLM phosphorylées avec les filaments d'actine donne naissance aux fibres de stress.
- L'inhibition de la cofiline (protéine responsable de la dépolymérisation des filaments d'actine), et donc la stabilisation de la structure des filaments (Toshima et al., 2001 ; Hinsbergh et al., 2002) (figure 8).

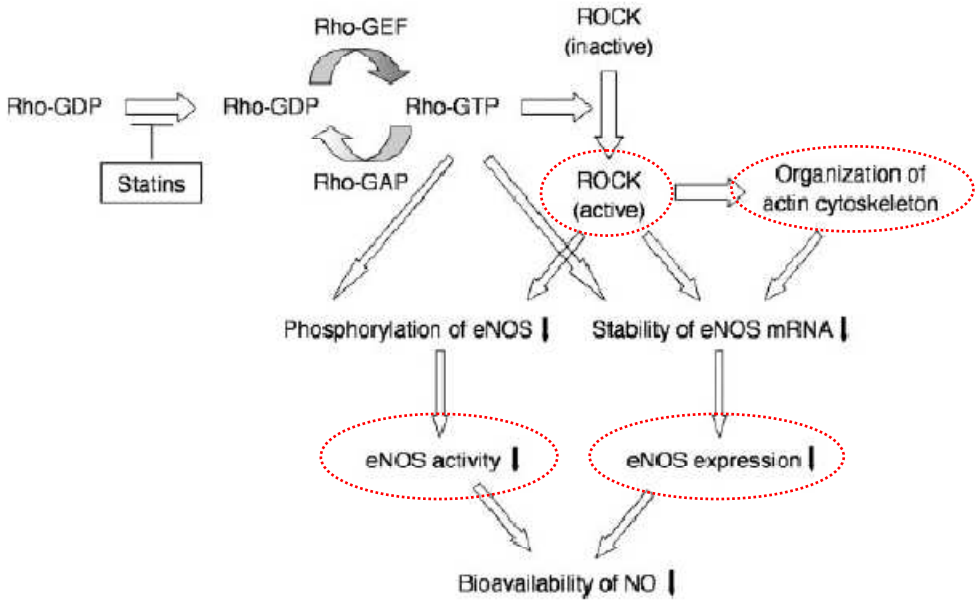


<u>Figure 8 :</u> schéma représentant le rôle de la Rho-kinase dans la stabilisation des filaments d'actine et la formation des fibres de stress dans la CE. La Rho-kinase inhibe la cofiline (enzyme qui dépolymérise les filaments d'actine) d'une part, et phosphoryle les chaînes légères de myosine (CLM) d'autre part. Les CLM phosphorylées et les filaments d'actine interagissent pour former les fibres de stress. (Hinsbergh et al., 2002)

D'autre part, la Rho-kinase a été identifiée comme un régulateur négatif de l'expression et de l'activation de la eNOS (figure 9). La Rho-kinase a un rôle au niveau transcriptionnel et post-translationnel dans la régulation de la eNOS. Son activation dans les CE entraîne une baisse dans l'expression de la eNOS. Au contraire, son inhibition entraîne une augmentation dans l'expression de l'enzyme (Li et al., 2002). Au niveau post-translationnel, la Rho-kinase

module l'activité de la eNOS via le rôle qu'elle joue dans la phosphorylation de l'enzyme (Seasholtz et al., 2004). Elle induit l'inhibition de la eNOS par phosphorylation directe du résidu Thr^{495} (Sugimoto et al., 2007) et en empêchant la phosphorylation du résidu Ser^{1177} (Ming et al., 2002). Récemment, Wolfrum et al., 2004 ont constaté que l'inhibition de la phosphorylation de la Ser^{1177} par la Rho-kinase était due à l'inhibition de la voie des PKB (Akt). Plus tard, Rikitake et al., (2005) ont rapporté que cette inhibition était consécutive à l'interférence de la Rho-kinase dans l'activation des Akt par les PI3K.

Tous les événements de signalisation induits par la Rho-kinase, conduisent à la diminution de la production de NO et donc favorisent l'hypertension artérielle, d'autant plus qu'une étude *in vivo* chez des rats, a révélé que l'administration orale de Fasudil (inhibiteur de la Rho-kinase) induit une augmentation du flux sanguin et une baisse de la tension artérielle (Bussemaker et al., 2007).



<u>Figure 9 :</u> schéma mettant en évidence le double rôle de la Rho-kinase dans la régulation de la structure du cytosquelette d'actine et l'activité de la eNOS. La Rho-kinase entraîne l'organisation du cytosquelette d'actine et la baisse de l'expression et de la phosphorylation de la eNOS. (Rikitake et al., 2005)

Le cytosquelette d'actine joue un rôle très important dans la mécanotransduction (Oritz et al., 2004). Plusieurs études ont porté sur son rôle dans la voie de signalisation de la eNOS. Conrad et al., (1995) et Fujimoto et al., (1995) ont rapporté que les caveolae et l'appareil de Golgi interagissent avec les filaments d'actine. Plus tard, Su et al., (2003) et Kondrikov et al., (2006) ont suggéré que la réorganisation du cytosquelette d'actine doit influencer la fonction des protéines cavéolaires, dont la eNOS, d'autant plus qu'une technique de co-immunoprécipitaion a démontré que la eNOS forme un complexe avec la cavéoline-1 et l'actine. L'incubation de la eNOS avec de la G ou de la F actine purifiées révèle que la eNOS est plus active en présence de G actine. Toutes ces données ont permis de confirmer que le stade de polymérisation de l'actine est un régulateur de l'activité de la eNOS.

V.6- Activation de la eNOS par les forces de cisaillement

Les vaisseaux sanguins sont en permanence soumis à des contraintes mécaniques associées à la pression artérielle pulsée, et au flux sanguin. Toute variation de ces contraintes est perçue au niveau des CE et se traduit par des modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux (Stoltz et al., 2003). Les CE sont capables de traduire les changements de forces physiques appliquées au vaisseau par des modifications du tonus du muscle lisse vasculaire, grâce à une modulation de la sécrétion endothéliale de facteurs vasoactifs diffusibles (Stoltz et al., 2007). Les forces de cisaillement constituent un stimulus physiologique pour la production de NO par les CE (Ozawa et al., 2004). De nombreux récepteurs présents à la surface des CE sont sensibles aux forces de cisaillement, tels que ceux des intégrines, qui relient la matrice extracellulaire aux sites d'adhésion focaux et au cytosquelette (Muller et al., 1999, 2004). Par ailleurs, les contraintes de cisaillement agissent sur les canaux ioniques, stimulent des récepteurs membranaires et induisent des cascades complexes d'événements biochimiques. De nombreuses voies de signalisation, telle que la voie des MAP-kinases, sont activées en réponse au flux sanguin et aboutissent à l'induction de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des gènes. Ainsi, par des mécanismes purement locaux, le vaisseau sanguin est capable de s'adapter à son environnement mécanique (Lehoux et al., 2006).

Il existe deux types de cisaillement :

- **Le cisaillement laminaire :** c'est celui qui est retrouvé dans les artères saines (dépourvues de sténose). Cet écoulement s'effectue par un déplacement parallèle de lames concentriques de liquide. Ce type d'écoulement comprend :

- **Le cisaillement continu :** ce type d'écoulement est caractéristique des petits vaisseaux. Il est caractérisé par un profil transversal des vitesses qui est parabolique (figure 10). Ainsi, la vitesse d'écoulement est nulle au niveau de la paroi et maximal au niveau de l'axe du vaisseau.
- **Le cisaillement pulsatile :** ce type d'écoulement est caractéristique des grosses artères, il présente un profil des vitesses plus complexe que celui de l'écoulement laminaire continu. Dans les grosses artères, le sang subit une succession d'accélérations et de ralentissements, au rythme des battements cardiaques. Il en résulte un profil beaucoup plus aplati que dans les vaisseaux périphériques avec même parfois une inversion du flux (figure 10).

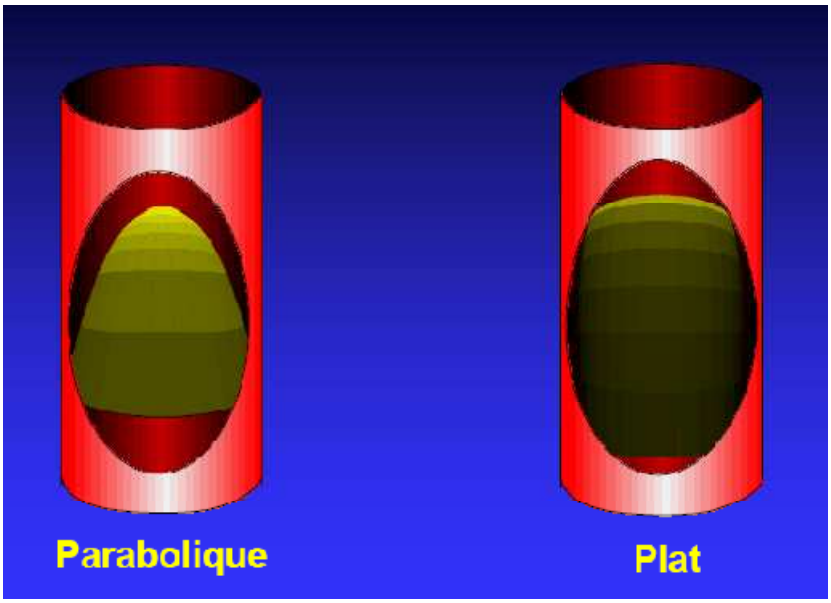


Figure 10 : schéma présentant les deux types de cisaillement laminaire. Le profil transversal (parabolique) est caractéristique des petits vaisseaux et traduit un cisaillement laminaire. Le profil plat est caractéristique des gros vaisseaux et traduit un cisaillement pulsatile. (http://w3med.univ-lille2.Fr).

- **Les écoulements turbulents :** les déplacements des différentes parties du liquide ne sont pas parallèles à l'axe du vaisseau, ce qui augmente la dépense énergétique de l'écoulement. La turbulence de l'écoulement est souvent caractérisée par la formation d'instabilités. Ce type d'écoulement apparaît dans les singularités vasculaires (sténoses, bifurcation,…) (figure 11). (Ecker et al., 1999).

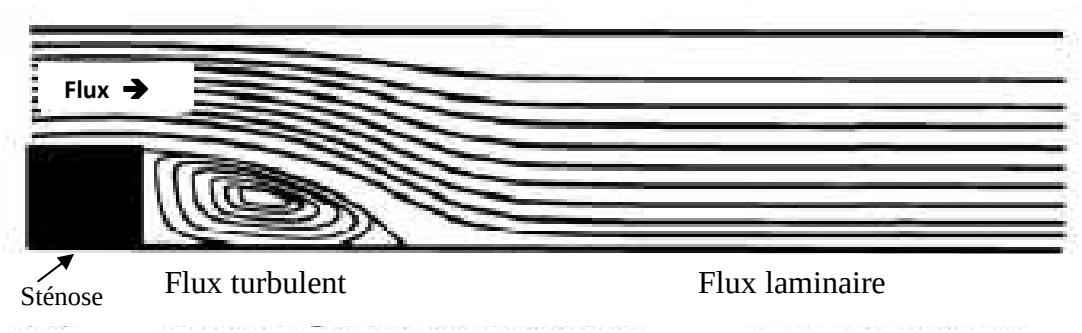


Figure 11 : schéma présentant un cisaillement turbulent caractérisé par la formation d'un tourbillon en aval d'une sténose (carré noir) (d'après Li et al., 2005)

Le comportement des CE varie en fonction du type de cisaillement auquel elles sont soumises. Le cisaillement laminaire, continu et pulsatile, augmente la transcription de la eNOS et favorise la stabilité des ARNm. Par ailleurs, il entraîne aussi la translocation et l'activation de cette enzyme (Korenaga et al., 1994 ; Noris et al., 1995 ; Wedgwood et al., 2003 ; Tao et al., 2006). Cette augmentation dépend de l'amplitude de la contrainte (Uematsu et al., 1995 ; Noris et al., 1995 ; Li et al., 2003). Les cellules situées au niveau de la paroi ressentent beaucoup plus de force et cela est dû aux forces de frottement qui sont beaucoup plus importantes au niveau de la paroi. Le tableau 1 résume les données hémodynamiques du système vasculaire humain, essentiellement les diamètres des vaisseaux et les caractéristiques de l'écoulement sanguin.

Au contraire, un écoulement turbulent semble n'avoir aucun effet sur l'expression ou l'activation de la eNOS (Noris et al., 1995). De ce fait, la contrainte de cisaillement que nous avons choisi d'appliquer à nos cellules dans cette étude, est le cisaillement laminaire continu, ceci pour se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques. En effet, ce cisaillement est caractéristique de la circulation périphérique qui, en clinique, contrôle la tension artérielle. Par ailleurs, il caractérise les vaisseaux sains et possède un effet positif sur activation de la eNOS.

Tableau 1 : **données hémodynamiques du système vasculaire humain (D'après Charara et al., 1993).**

Type de vaisseaux	Diamètre (cm)	Vitesse locale (cm/s)	Vitesse de cisaillement à la paroi (s^{-1})	Contrainte de cisaillement à la paroi (Pa)
Aorte ascendante	2,0-3,2	60	180	0,7
Aorte descendante	1,6-2,0	30	130	0,5
Larges artères	0,2-0,6	20-50	300-800	1,1-3,0
Artérioles	0,004	0.5	500-1,600	1,9-6,0
Capillaires	0,0005-0,001	0,5-0,1	800	3,2
Veinules	0,005-0,01	0,2-0,4	320	
Veines	0,5-1,0	15-20	20-200	0,076-0,76
Veine cave	2,0	10-15	50	0,2
Vaisseaux sténotiques			800-10 000	3,0-3,8

V.6.1- Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activation de la eNOS en réponse aux différents types de cisaillement

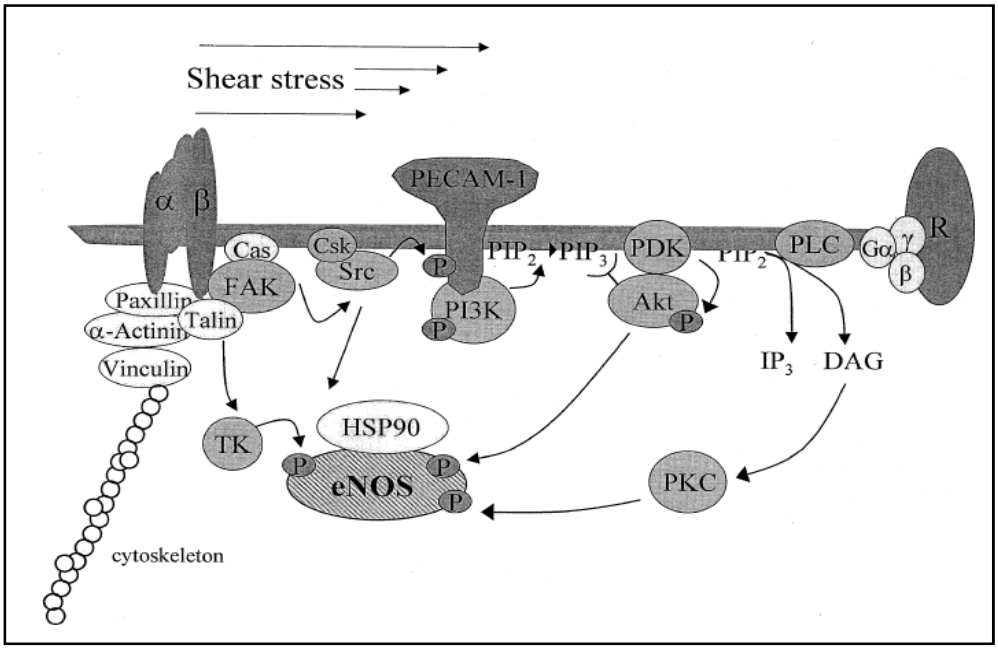
La réponse des CE aux forces de cisaillement est régulée par des mécanismes cellulaires très complexes impliquant plusieurs protéines et kinases. Les éléments impliqués dans cette réponse peuvent varier selon le type de la contrainte.

L'activation de la eNOS en réponse au cisaillement laminaire dépend de l'activation de la **PKC.** Celle-ci aurait un rôle dans l'augmentation de l'expression du gène de l'enzyme (Wedgwood et al., 2001), la réponse impliquerait aussi l'activation de la **PI3K** et la **Akt** via l'activation des **PECAM-1** (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) qui jouent un rôle dans la transmission des signaux favorisant l'activation de différentes voies de signalisation. Le cisaillement laminaire entraîne la translocation de la protéine chaperon **Hsp90**, connue comme l'une des protéines qui interagit avec la eNOS (Pritchard et al., 2001 et Fontana et al., 2002). L'inhibition des Hsp90 ou des PI3K empêcherait la translocation et la phosphorylation de la eNOS. Au même titre que la phosphorylation de la Akt et de la eNOS, le cisaillement laminaire entraîne aussi la phosphorylation des **Gab1 tyrosine** *(Gab1 sont des récepteurs membranaires qui interagissent avec des protéines appelées « adaptateurs moléculaires Grb2 » responsables du couplage des récepteurs à leur cible proximale).* Ainsi, Gab1 active les PI3K qui à leur tour activent les Akt. Les **Src kinase** et les **VEGFR2 kinase** *(VEGFR2 : récepteur membranaire du VEGF à activité tyrosine kinase)* sont impliqués dans cette voie car leur inhibition empêche la phosphorylation de la Akt et de la eNOS en réponse aux forces de cisaillement (Jin et al., 2003).

Le cisaillement laminaire pulsatile augmente également l'expression et l'activité de la eNOS via la phosphorylation de la eNOS sur le résidu Ser^{1177} via les **Akt** et les **PI3K** (Li et al., 2004 ; Li et al., 2005).

Implication du Ca^{+2}

Il est connu que les forces de cisaillement augmentent rapidement la concentration intracellulaire en Ca^{+2}, mais il a été rapporté que l'activation de la eNOS serait indépendante du complexe Ca^{+2}/calmoduline et qu'elle serait uniquement dépendante des interactions des kinases **PKC**, **PI3K** et **Akt** tel que le montre la figure 12 (Ayajiki et al., 1996 ; Fleming et al., 1998 ; Fleming et al., 1999 ; Fisslthaler et al., 2000 et Ungvari et al., 2001).



<u>Figure 12 :</u> les différentes voies impliquées dans l'activation de la eNOS en réponse à un cisaillement laminaire. Le cisaillement laminaire entraîne une phosphorylation de la eNOS via l'activation de la voie PKC/Akt et induit la translocation des HSP90. (Fisslthaler et al., 2000).

Nous avons exposé les différentes voies de régulation de la production de NO par les CE, en évoquant les facteurs influençant la eNOS aux niveaux transcriptionnel, translationnel ou post-translationnel. Cette régulation implique une multitude de mécanismes cellulaires gérés par des protéines et des kinases appartenant à plusieurs voies cellulaires de signalisation. Tout dysfonctionnement dans ces mécanismes de régulation se traduit par une carence dans la production de NO. Cette carence, quelle que soit son origine, entraîne des complications dans le fonctionnement du système cardiovasculaire, principalement l'hypertension artérielle (HTA) qui est l'un des objectifs de notre travail.

VI- L'hypertension artérielle (HTA)

L'HTA est l'augmentation de la pression artérielle. Cliniquement, elle se caractérise par une pression systolique égale ou supérieure à 160 mmHg ou une pression diastolique égale ou supérieure à 95 mmHg (Antoine et al., 1993). On distingue :

- l'HTA essentielle : qui est un facteur de risque fréquent retrouvé dans la population. 95% de l'HTA est essentielle présentant un facteur de risque cardiovasculaire à part entière.

- l'HTA secondaire, qui concerne 5% des hypertensions. L'étiologie est surénalienne, rénale ou toxique ; sa mise en évidence autorise la mise en place d'un traitement spécifique qui peut être une sanction médicamenteuse spécifique ou une sanction intérventionnelle (dilatation d'une artère rénale sténosée par exemple, ou une sanction chirurgicale).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons à l'HTA essentielle qui pourrait être due à un dysfonctionnement dans la balance de production des agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs, qui est partiellement dû à un dysfonctionnement sympathique postsynaptique (Gauthier et al., 2007). Le dysfonctionnement du mécanisme de production des agents vasodilatateurs entraîne une rigidité de la paroi du vaisseau causée par la contraction du muscle lisse vasculaire. Le vaisseau étant moins élastique, ne peut plus s'adapter aux fluctuations de l'écoulement sanguin, ce qui se traduit par une augmentation de la pression à l'intérieur.

VI.1- Le traitement de l'HTA

Pour traiter une HTA, deux actions peuvent être suivies en fonction du stade et de l'importance de la maladie.

VI.1.1- Règles hygiéno-diététiques : diminution du tabac, pratique d'exercice, limitation de consommation de sel et/ou de produits riches en calcium,...

VI.1.2- Un traitement médicamenteux : il existe différentes classes de médicaments adaptés selon le type de pathologie. Les plus utilisés en général sont :

VI.1.2.1- Ceux en interaction avec le système rénine-angiotensine : ce sont des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) qui bloquent la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cette dernière est une hormone vasoconstructrice responsable de l'augmentation de la pression sanguine.

VI.1.2.2- Les antagonistes des récepteurs d'angiotensine (ARA) : qui bloquent les effets de l'angiotensine II.

VI.1.2.3- Les inhibiteurs calciques (antagonistes calciques) : ils agissent comme antagonistes sur le calcium (responsable de l'activation des muscles lisses dans les vaisseaux cardiaques). Avec ces anticalciques, les muscles lisses sont davantage relâchés et la pression sanguine diminue.

VI.1.2.4- Les diurétiques : l'action de ces médicaments favorise l'élimination de l'eau et du sodium, ce qui diminue la volémie donc la pression sanguine.

VI.1.2.5- Les β bloquants : ce sont des molécules qui inhibent les récepteurs adrénergiques β, empêchant la fixation du neurotransmetteur (noradrénaline) et diminuant largement la stimulation par le système nerveux sympathique responsable d'une réaction au stress ou à l'activité physique. En agissant sur ce système, les β bloquants inhibent en partie les réactions responsables en général d'une augmentation de la pression sanguine. Pour comprendre les effets des β bloquants, il faut d'abord rappeler le rôle exact des récepteurs β adrénergiques dans le système cardiovasculaire.

VI.2- Les récepteurs adrénergiques

C'est une classe de récepteurs couplés aux protéines G qui sont la cible des catécholamines. Ils se lient de préférence à leurs ligands endogènes, les catécholamines adrénaline et noradrénaline, et sont activés par elles. De nombreuses cellules possèdent de tels récepteurs, et la liaison d'un agoniste incite en général la cellule à répondre par une réaction de stress. À ce jour, deux familles de ces récepteurs sont connues.

- Les récepteurs α adrénergiques : on distingue les récepteurs α1 et α2.
- Les récepteurs β adrénergiques : on distingue les récepteurs β1, β2 et β3.

VI.2.1- Les récepteurs α-adrénergiques

La stimulation de ces récepteurs provoque une intense vasoconstriction et semble dépourvue d'action directe sur le myocarde. Leur stimulation augmente la concentration du Ca^{+2} cytosolique par des mécanismes différents : pour les α1, par activation de la voie du

phosphatidylinositol qui aboutit à la libération du Ca^{+2} à partir de ses sites de stockage intracellulaires ; pour les α2, par ouverture des canaux calciques agonistes-dépendants (ROC).

VI.2.2- Les récepteurs β adrénergiques

La stimulation de ces récepteurs induit la formation d'AMPc à partir de l'ATP, second messager qui active la PKA. Celle-ci phosphoryle diverses protéines. Les récepteurs adrénergiques β se divisent en trois types : β1, β2 et β3. Les récepteurs β1 sont prédominants au niveau cardiaque, alors que les récepteurs β2 le sont au niveau vasculaire et bronchique ; les récepteurs β3 ont été récemment identifiés et leur distribution est variable selon les tissus et les espèces. Ils se distinguent des récepteurs β1 et β2 par leur structure moléculaire, leur régulation et leurs caractéristiques pharmacologiques (Rouget et al., 2004). Il a été rapporté qu'après une longue exposition à un agoniste, les récepteurs β1 et β2 subissaient une désensibilisation. Celle-ci est accompagnée par une baisse dans leur expression. Par contre les récepteurs β3 résistent et leur expression reste constante dans les cellules (Rouget et al., 2004). Il a été donc suggéré qu'après une longue stimulation par le système nerveux sympathique, la réponse des récepteurs β3 continuait alors que celle des récepteurs β1 et β2 diminue. De ce fait, les récepteur β3 maintiennent plus longtemps la réponse aux stimulations par le système nerveux sympathique.

VI.3- Effets cardiovasculaires des récepteurs adrénergiques

A l'opposé de la stimulation α-adrénergique, la stimulation β se traduit au niveau des vaisseaux par une vasodilatation atténuant l'effet de la vasoconstriction α-adrénergique. La stimulation β-vasculaire est de type β2 et se fait par l'intermédiaire d'une augmentation de l'AMPc. Dans le cas où la stimulation β est isolée, le débit cardiaque s'accroît par suite de la baisse de la résistance à l'éjection systolique et de l'augmentation de la fréquence ainsi que de la force des contractions cardiaques.

VI.3.1- Les effets β1

L'activation des récepteurs adrénergiques β1 entraîne une activation cardiaque (contraction des fibres myocardiques) : la phosphorylation des canaux calciques par la PKA entraîne leur ouverture, générant ainsi un influx calcique qui va participer à la contraction. Le Ca^{+2} se fixe à la troponine C, induisant l'interpénétration des filaments d'actine et de

myosine. La force de contraction cardiaque dépend du degré de phosphorylation des canaux calciques.

VI.3.2- Les effets β2 et β3

L'activation de ces récepteurs favorise la relaxation des muscles lisses et la production de NO par les CE (de Groot et al., 2003). Les mécanismes régulant la contractilité des muscles lisses (vasculaires, bronchiques, utérins,…) sont différents de ceux régulant la contractilité cardiaque, le Ca^{+2} se fixe sur la calmoduline (et non pas sur la troponine C). L'affinité du complexe Ca^{+2}/calmoduline pour l'ATPase de la myosine dépend du degré de phosphorylation de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). Lorsque cette kinase est phosphorylée sous l'action de la PKA, l'affinité du complexe Ca^{+2}/calmoduline pour l'ATPase de la myosine diminue, aboutissant à une relaxation des fibres lisses.

Dans les vaisseaux sanguins, la présence prédominante des récepteurs β2 et β3 dont le rôle est d'induire la vasorelaxation, a suscité le développement d'agonistes et d'antagonistes. Ces molécules constituent une nouvelle cible thérapeutique appropriée dans le traitement de l'HTA. Le tableau 2 rassemble les différentes molécules étudiées dans la littérature, agonistes ou antagonistes des récepteurs β adrénergiques.

<u>Tableau 2 :</u> les différentes molécules possédant un effet agoniste ou antagoniste sur les trois types de récepteurs β adrénergiques (β1, β2 et β3)

	Récepteurs β1		Récepteurs β2		Récepteurs β3		
Molécule	Agoniste	Antagoniste	Agoniste	Antagoniste	Agoniste	Antagoniste	**Références**
Acebutolol		x					Sirotiakova et al., 2002 Schroder et al., 2005
Alprenolol		x		x			Das et al., 1994
Atenolol		x					Ignarro et al., 2002 Tzemos et al., 2001 Kamp et al., 2003 Chlopicki et al., 2002 Lekakis et al., 2005
Betaxolol		x					Yu et al., 1998
Bisoprolol		x					Kakoki et al., 1999 Wehling et al., 2002
Bopindolol		x					Kakoki et al., 1999
BRL 37344					x		Arch et al., 1993. Emorine et al., 1994. Stosberg et al., 1996 De Groot et al., 2003 Pott et al., 2006 Imbrogno et al., 2006
Bucindolol		x		x			Blin et al., 1993.
Bupranolol		x		x		x	Gosgnach et al., 2001 Evangelista et al., 2007 Dessy et al., 2005
Butoxamine				x			De Groot et al., 2003 Gosgnach et al., 2001
Carvedilol		x		x			Kalinowski et al., 2003 Zeitz et al., 2000 Wehling et al., 2002
Celiprolol		x					Kakoki et al., 1999
CGP 12177A		x		x			Liggett et al., 1992. Blin et al., 1993. Kaumann et al., 1996. Molennar et al., 1997.
CL 316243					x		Arch et al., 1993. Emorine et al., 1994. Stosberg et al., 1996
S-(-)-Cyanopindolol						x	Gosgnach et al., 2001 De Groot et al., 2003
Dobutamine	x						Kakoki et al., 1999
ICI118 551				x			Maffei et al., 2007

Isoproternol							Toumaniantz et al., 2005
Labetalol		x		x			Yoshioka et al., 2000
L 748337						x	Chlopicki et al., 2002
Metoprolol		x					Ladage et al., 2006 De Groot et al., 2003 Wehling et al., 2002
Nadolol		x		x			Evangelista et al., 2007 Dessy et al., 2005 Imbrogno et al., 2006
Nébivolol		x	x		x		Gosgnach et al., 2001 Ignarro et al., 2002 Lekakis et al., 2005 Ladage et al., 2006
Oxprenolol		x		x			Lee et al., 1991 Wehling et al., 2002
Penbutolol		x		x			Wehling et al., 2002
Pindolol		x		x			Blin et al., 1993 Wehling et al., 2002
Propanolol		x		x			Gosgnach et al., 2001
Propranolol		x		x			Kalinowski et al., 2003 Kakoki et al., 1999 Wehling et al., 2002
Salbutamol			x				Kakoki et al., 1999
Sotalol		x		x			Krstic et al., 1996
SR 58611A					x		Arch et al., 1993. Emorine et al., 1994. Stosberg et al., 1996
SR 59230A						x	De ponti et al., 1996 Manara et al., 1996 Maffei et al., 2007 Evangelista et al., 2007 Ladage et al., 2006 Imbrogno et al., 2006
SR 59483A						x	De ponti et al., 1996 Manara et al., 1996
Timolol		x					Yu et al., 1998

VI.4- Mécanismes de l'effet antihypertenseur des β bloquants

L'effet antihypertenseur dépend du blocage des récepteurs β1 adrénergiques ou de l'activation des récepteurs β2 ou β3. Le mécanisme de l'effet antihypertenseur passe par l'une de ces actions :

- La baisse du débit cardiaque.

- La diminution de la contractilité cardiaque : elle entraîne une diminution du volume d'éjection, surtout à l'exercice, d'où celle de la pression artérielle systolique.

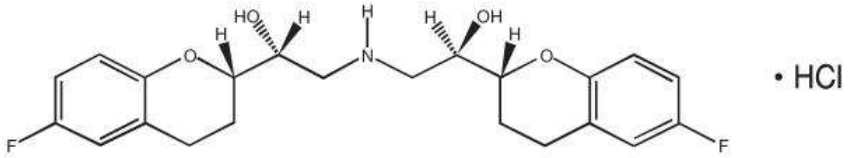
- La baisse de la production de rénine.

- L'augmentation de la production de NO.

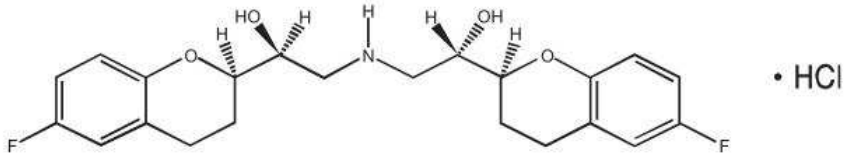
VII- Traitements de l'HTA avec le Nébivolol

VII.1- Définition et structure de la molécule

Le Nébivolol appartient à la troisième génération des β bloquants cardiosélectifs. Il est commercialisé en France depuis 2004 pour traiter l'HTA. Le Nébivolol est un antagoniste sélectif des récepteurs β1 (Broeders et al., 2000), son profil hémodynamique diffère de celui des autres antagonistes des récepteurs β adrénergiques, car il provoque une vasodilatatation démontrée aussi bien chez l'animal que chez l'être humain (de Groot et al., 2003). Le Nébivolol est composé d'un mélange de deux énantiomères D et L (figure 13) possédant chacun un rôle bien défini. Le L-Nébivolol est davantage actif que le D-Nébivolol en terme d'induction de la vasorelaxation. Il a été rapporté que la forme L-Nébivolol est responsable de l'activité β1 antagoniste et que la forme D-Nébivolol induit une activité vasodilatatrice (Chlopicki et al., 2002 ; Evangelista et al., 2007). Le Nébivolol, prescrit pour les maladies cardiovasculaires, réduit la fréquence cardiaque et la pression artérielle des sujets hypertendus ; il diminuerait aussi le stress oxydatif et augmenterait la production de NO par les CE (Ignarro et al., 2002 ; Evangelista et al., 2007).



SRRR- ou D-Nébivolol chlorhydrate



RSSS- ou L-Nébivolol chlorhydrate

PM = 441,90 g/mole

<u>Figure 13 :</u> structure chimique des deux énantiomères L et D composant la molécule de Nébivolol (http://www.drug.com)

VII.2- Modes d'actions

Ces dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la vasodilatation induite par le Nébivolol. La majorité des références bibliographiques rapporte l'effet vasodilatateur à son implication dans la voie de synthèse de NO, et donc à l'activation de la eNOS. Les recherches effectuées sur le mode d'action montrent l'implication de l'endothélium, plus précisément de la eNOS, ainsi que de tous les éléments influençant l'activité de cette enzyme (tels que la PKA, PI3K, l'Akt, le complexe Ca^{+2}/calmoduline,…).

Les résultats des recherches effectuées sur les mécanismes cellulaires impliqués dans l'action vasodilatatrice du Nébivolol ont provoqué des controverses au fil des années. Dans la partie suivante de cette étude bibliographique, nous allons décrire les différentes actions présentes dans la littérature à ce jour.

VII.2.1- Mécanisme dépendant de l'endothélium

L'effet hypotenseur du Nébivolol est dû à son interaction avec la voie menant à la production de NO. NO étant essentiellement produit par les CE, il a été suggéré que l'effet hypotenseur du Nébivolol était dépendant de la présence de l'endothélium. La surface membranaire des CE présente plusieurs récepteurs via lesquels la cellule perçoit et répond aux stimulations externes (mécaniques ou biochimiques). Parmi ceux-ci, on distingue les récepteurs adrénergiques précédemment définis.

Le Nébivolol appartenant à la classe pharmacologique des β bloquants, il semblait important de comprendre l'implication de ces récepteurs endothéliaux dans l'effet hypotenseur du médicament.

VII.2.1.1- Implication des récepteurs β adrénergiques

Plusieurs études des mécanismes cellulaires et des voies de signalisation aboutissant à cette vasodilatation ont été effectuées. Ces analyses ont suggéré que l'activité vasodilatatrice du Nébivolol peut impliquer les récepteurs adrénergiques β2 et/ou β3 (Broeders et al., 2000 ; Evangelista et al., 2007 ; Georgescu et al., 2005 ; de Groot et al., 2003). Cependant, Gosgnach et al., (2001) ; Dessy et al., (2005) ; Rozec et al., (2006) et Maffei et al., (2007) ont rapporté un mécanisme dépendant des récepteurs β3 mais indépendant des récepteurs β2. A l'inverse, d'autres travaux ont révélé un mécanisme vasodilatateur du Nébivolol totalement indépendant aussi bien des récepteurs β2 que des récepteurs β3 (Kalinowski et al., 2003 ; Chlopicki et al., 2002).

VII.2.1.2- Implication de la eNOS et du complexe Ca^{+2}/calmoduline

Selon certain auteurs, le Nébivolol augmente la production de NO par les CE en activant la eNOS et la guanylate cyclase (GC). Il entraîne la translocation et la phosphorylation de la eNOS sur le résidu Ser^{1177}. Cette phosphorylation s'accompagne d'une augmentation du taux de phosphorylation des PKA et des Akt (Gosgnach et al., 2001 ; Ladage et al., 2006 ; Parenti et al., 2000 ; Kalinowski et al., 2003 ; Ignarro et al., 2002). En revanche, le mécanisme par lequel le Nébivolol entraîne l'activation de la eNOS et en particulier les récepteurs impliqués dans cette activation restent encore à élucider.

Le Nébivolol entraîne une augmentation de la concentration du Ca^{+2} cytosolique suivi de la déphosphorylation de la eNOS sur le résidu Thr^{495} (Dessy et al., 2005). Cette réponse serait aussi dépendante de la phospholipase C (responsable de l'augmentation de la concentration du Ca^{+2} intracellulaire) et du complexe Ca^{+2}-ATPase du réticulum endoplasmique (Parenti et al., 2000). D'après ces auteurs, l'effet vasodilatateur du Nébivolol est donc totalement dépendant de l'activation de la eNOS par le complexe Ca^{+2}/calmoduline. Cependant, Gosgnach et al., (2001) ont démontré que l'inhibition de la calmoduline n'inhibe pas la vasodilatation induite par Nébivolol et que ce dernier n'a pas d'effet sur l'activité de la phospholipase C, ni sur la concentration cytosolique du Ca^{+2}. Ces controverses montrent combien l'action du Nébivolol reste à élucider.

Autres mécanismes possibles

VII.2.1.3- Implication de la iNOS

Un autre mécanisme d'action du Nébivolol a été récemment identifié sur des coupes de cœurs isolés de souris, suggérant qu'il stimule l'activité de la forme inductible de la NOS (iNOS) (Maffei et al., 2007). L'expression de la iNOS augmente lors d'une pathologie cardiaque, ce qui serait délétère pour le coeur (Haywood et al., 1996). Mais Maffei et al., (2007) ont rapporté que l'expression de cette isoforme compenserait le déficit de NO par la voie de la iNOS. Ce mécanisme limiterait, selon ces auteurs, la réponse contractile des récepteurs adrénergiques β1 dans les myocytes.

VII.2.1.4- Implication des récepteurs 5-HT

En plus des récepteurs β adrénergiques, certaines études ont mentionné l'implication des récepteurs sérotoninergiques 5HT dans l'effet vasodilatateur du Nébivolol. L'activation de ces récepteurs joue un rôle dans la production de NO (de Groot et al., 2003 ; Kakoki et al., 1999 ; Gosgnach et al., 2001). Cependant cette hypothèse a été contredite par Chlopicki et al., (2002) et Kalinowski et al., (2003) qui ont prouvé que l'effet vasodilatateur du médicament n'était pas lié à des effets agonistes de ces récepteurs.

VII.2.1.5- Implication de la phospholipase A2

Les résultats de Gosgnach et al., (2001) ont révélé que le Nébivolol augmente l'activité de la phospholipase A2 et de l'adénylate cyclase (AC), et induit une augmentation de l'expression de la prostacycline ainsi que de l'AMPc dans les CE. Ils ont alors suggéré que la vasodilatation induite par le Nébivolol serait phospholipase A2 et adénylate cyclase dépendante, et que la production de la prostacycline pouvait représenter un mécanisme supplémentaire à celui de NO pour la vasodilatation.

VII.2.1.6- Implication des récepteurs P2Y (purinocepteurs)

L'activation des récepteurs P2Y induit une vasodilatation via l'augmentation de la production de NO et de la prostacycline (Shalev et al., 1999). Cette réponse implique l'activation de la PKC (Patel et al., 1996). Ces récepteurs participent également à la transmission du Ca^{+2} du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Fam et al., 2000).

La production de NO dans les CE est stimulée entre autres par l'ATP extracellulaire qui constitue un facteur de signalisation autocrine ou paracrine. Par ailleurs, l'ATP joue aussi un rôle important dans l'activation des récepteurs P2Y. Silva et al., (2006) ont fait le rapport entre ces évènements cellulaires et ont montré que l'ATP stimule la production de NO via l'activation des P2Y. Ainsi, les récepteurs P2Y ont un rôle dans l'activation de la eNOS. Kalinowski et al., (2003) se sont alors intéressés à l'implication de ces récepteurs dans les mécanismes d'action du Nébivolol, et ont trouvé un lien direct entre ces récepteurs P2Y et l'augmentation de la production de NO.

Les récepteurs œstrogène auraient aussi un rôle dans la réponse au Nébivolol d'après Garban et al., (2004).

VII.2.2- Mécanisme indépendant de l'endothélium

L'effet vasodilatateur du Nébivolol pourrait aussi être indépendant de l'endothélium. Il a été démontré que le Nébivolol peut induire directement la vasorelaxation du muscle lisse vasculaire dans des anneaux d'artères de rats dénudées de leur endothélium. Cette vasorelaxation impliquerait la GMPc ainsi que NO, mais le mécanisme exact de cette relaxation est encore inconnu (Ignarro et al., 2002). Ces auteurs ont suggéré l'implication du facteur de relaxation musculaire MDRF (produit par les CMLs). Ce facteur a été découvert en

1990 par l'équipe de Wood (Wood et al., 1990) qui a rapporté qu'il présenterait des propriétés physicochimiques voisines du NO et de ce fait, aurait une action de relaxation sur les CMLs.

Le tableau suivant (tableau 3) récapitule les travaux effectués sur le Nébivolol selon le protocole expérimental utilisé (le type d'échantillons, les traitements infligés aux cellules et le temps d'incubation). Ceci permettra de mettre en évidence les différences et les similitudes des résultats obtenus sur les mécanismes d'action du Nébivolol.

Tableau 3 : les différents mécanismes d'action du Nébivolol étudiés dans la littérature. Les principales voies étudiées sont : l'implication de la eNOS, les récepteurs β1, β2 et β3, les récepteurs 5-HT, le complexe Ca^{+2}/calmoduline et l'endothélium.

Références	Echantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Laadage et al., 2002	HUVEC	Nébivolol Métoprolol Nébivolol + SR 59230A Nébivolol + ICI 128780 (inhibiteurs des récepteurs estrogènes)	10µM 10µM 1µM 1µM	5, 10, 15 min	+ NO Translocation de la eNOS dans la région périnucléaire. Pas d'effet sur la production du NO. - NO. - NO.	L'activité vasodilatatrice du Nébivolol est dépendante des récepteurs adrénergiques β3
Evangelista et al., 2007	HUVEC	DL Nébivolol L Nébivolol D Nébivolol DL Nébivolol + Nadolol DL Nébivolol + SR 59230A	10µM 10µM 10µM 10µM 2µM 10µM	5 min	+++ NO / + Ca^{+2} intracellulaire / - ROS et superoxide +++ NO / + Ca^{+2} intracellulaire /- ROS et superoxide + NO / pas d'effet sur [Ca^{+2}] - NO / - Ca^{+2} intracellulaire -NO / - Ca^{+2} intracellulaire -NO / - Ca^{+2} intracellulaire	1) La vasodilatation induite par le Nébivolol est dépendante du Ca^{+2} et des récepteurs β2 et β3 et est due à l'énantiomère L . 2) Le Nébivolol possède une activité antioxydante.

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Dessy et al., 2005	BAEC (bovine aortic ECs)	Nébivolol	1µM	5min	+ NO / +Ca^{+2} intracellulaire / eNOS p (Ser^{1177}) + déphosphorylation du site Thr^{495}.	1) L'action du Nébivolol dépend de l'activation de la eNOS et de la présence de l'endothélium. 2) L'action du Nébivolol est indépendante des récepteurs β1 et β2, et dépendante des récepteurs β3.
		LNAME	1mM		-NO	
		VEGF	40 ng/ml		eNOS p (Ser^{1177})	
		Bradykinine	100nM		déphosphorylation du site Thr^{495} de a eNOS	
		Nébivolol+			N'inhibe pas l'effet du Nébivolol	
		Nadolol			Inhibe l'effet du Nébivolol	
		Nébivolol+ Bupranolol				
	Micro artères coronaires humaines	Endothéline 1	10nM		Contraction des artères	
		Nébivolol	10µM		Relaxation des artères pré-contractées	
		Nébivolol + Nadolol	10µM 10µM		N'inhibe pas la relaxation induite par le Nébivolol	
		Nébivolol / - endothélium	10µM		Inhibition de la relaxation induite par le Nébivolol	
		Nébivolol + Bupranolol	10µM		Inhibition de la relaxation induite par le Nébivolol	
	Souris génétiquement déficientes en récepteurs β3	Nébivolol			Inhibition de la relaxation induite par le Nébivolol	

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Gosgnach et al., 2001	HUVEC	Nébivolol	10µM	3min, 15min	Pas de changement dans [Ca^{+2}] intracellulaire, ni de la production d'inositol phosphate Augmente l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) Augmente la production de prostacycline	Le Nébivolol possède un mécanisme dépendant des récepteurs adrénergiques β3 via un mécanisme indépendant du Ca^{+2} et qui impliquerait la PLA2 et l'adénylate cyclase.
		Nébivolol	1/ 10/ 100µM	24h	Augmentation dose-dépendante de la production de AMPc et de NO.	
		Nébivolol + Propanolol ou Butoxamine			Pas d'inhibition de l'augmentation de AMPc	
		Nébivolo l+ Bupranolol ou Cyanopindolol	0,1/ 10µM 1µM		Inhibition de l'augmentation de l'AMPc et du NO	
		ATP (control +)	100µM		Augmentation du Ca^{+2} intracellulaire + Augmentation de la production de l'inositol phosphate.	

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Parenti et al., 2000	Lit vasculaire mésentérique	Noradrénaline + Nébivolol - Endothélium + LNAME + U73122 (inhibiteur de PLC) + Thapsigargin (inhibiteur de Ca^{+2}-ATPase du réticulum endoplasmique)	30µM 3/30µM 100µM 1µM 1µM	30min	Contraction Relaxation du lit vasculaire pré-contracté Inhibition de la relaxation du lit vasculaire pré-contracté	Le Nébivolol induit une vasorelaxation via l'activation du métabolisme de l'inositol phosphate et l'activation de la eNOS
	CVEC (capillary venular endothelial cells)	Nébivolol Nébivolo + Thapsigargin **ou** LNAME	100nM/ 1µM 10/30µM 10µM 1µM 2mM	15min 10min	Pas d'effet sur la concentration de l'inositol triphosphate Augmentation de la concentration de l'inositol triphosphate Augmentation de l'activité de la eNOS Baisse de l'activité de la eNOS	

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Kalinowski et al., 2003	Vaisseaux glomérulaires **et** GECs (rat glomerular ECs)	Ang II	1µM	3/10/30 min	Contraction des vaisseaux	Le Nébivolol induit la relaxation vasculaire et la production de NO par les CE par un mécanisme dépendant de l'ATP et de l'activation des récepteurs purinergiques P2Y.
		Nébivolol/Carvedilol/ ATP	1µM		Relaxation des vaisseaux pré-contractés+ Augmentation de la production du NO et d'ATP par les GECs.	
		Apyrase (élimine l'ATP extracellulaire)	10U/mL		Inhibition de la relaxation et de la production du NO et d'ATP induite par le Nébivolol et le Carvédilol	
		L-NNA (inhibiteur de eNOS)	100µM			
		Suramine **ou** Réactive blue 2 (inhibiteurs des récepteurs purinérgiques P2Y)	10µM 50µM			
		ODQ (inhibe l'activation de la GC par le NO)	10µM			
		GD3+ (inhibiteur non sélectif de l'ouverture des canaux cationiques)	200µM			
		1400W (inhibiteur de iNOS)	100µM		N'inhibe pas la ralaxation ni la production du NO induite par le Nébivolol et le Carvédilol	

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Chlopicki et al., 2002	Cœurs de cobayes isolés et perfusés grâce à l'appareil de Langendorff	D-Nébivolol / L-Nébivolol Atenolol L-NAME Nadolol L-748337 NAN-190 / Way 10063 (inhibiteurs de 5-HT) Sérotonine (control +) NAN-190 / Way 10063	30µM 30µM 100µM 10µM 1µM 1/5µM 1/5µM		Vasodilatation Pas de vasodilatation + réduction du niveau de cisaillement. Inhibition de la vasodilatation induite par D/L-Nébivolol. Pas d'inhibition de la vasodilatation induite par le Nébivolol. Vasodilatation Inhibition de la vasodilatation induite par la sérotonine.	L'action vasodilatatrice du Nébivolol est indépendante des récepteurs β2 /β3 et des récepteurs 5-HT, par contre, elle implique la eNOS.
De Groot et al., 2003	Anneaux d'aorte de rat	Nébivolol BRL37344 - Endothélium L-NNA S-(-)-Cyanopindolol NAN-190 / Méthysérgide (antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-$HT_{1/2}$ respectivement) Butoxamine	3/10µM 1/10µM 100µM 1µM 50µM		Relaxation dose-dépendante du muscle lisse des anneaux d'artère. Inhibition de la relaxation Pas d'inhibition de la relaxation induite par le Nébivolol	Le Nébivolol induit la vasorelaxation via un mécanisme dépendant des récepteurs adrénergiques β3 et indépendant des récepteurs sérotoninergiques 5-HT.

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Ignarro et al., 2002	Anneaux d'artères coronaires et pulmonaires de chien	+ Endothélium + Nébivolol NMA (inhibiteur de la eNOS) + L-arginine - Endothélium + Nébivolol **+Endothélium:** NMA (inhibiteur de la eNOS) Oxyhémoglobine Bleue de méthylène (favorise l'inactivation oxydative du NO) ODQ Zaprinast (inhibiteur de GMPc phosphodiestérase-5)	30µM 1µM 10µM 10µM 30µM	20min	Relaxation des anneaux Inhibition de la relaxation Rétablissement de la relaxation Pas de relaxation Inhibition de la relaxation Inhibition de la relaxation Inhibition de la relaxation Inhibition de la relaxation Augmentation de la relaxation due au Nébivolol	Le Nébivolol en présence ou absence de l'endothélium, relaxe les CMLs par un mécanisme dépendant du NO et du GMPc. La dépendance ou pas de l'endothélium varie selon l'espèce. De ce fait, le Nébivolol peut avoir un effet direct sur les CMLs par un mécanisme qui n'est pas encore connu, mais qui *a priori* serait indépendant de la eNOS.
	Anneaux d'aorte de rat	+ Endothélium + Nébivolol NMA + L-arginine - Endothélium + Nébivolol NMA **+/- Endothélium** Oxyhémoglobine Bleue de méthylène ODQ	 1µM 10µM 10µM		Relaxation Inhibition de la relaxation Rétablissement de la relaxation Relaxation Pas d'inhibition de la relaxation Inhibition de la relaxation Inhibition de la relaxation induite par le Nébivolol	

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Maffei et al., 2007	Cœurs de souris isolés et perfusés grâce à l'appareil de Langendorff	Nébivolol Atenolol L-NAME L-NIL (inhibiteur de iNOS) SR59230A 7-Nitroindazole (inhibiteur de nNOS) ICI118 551	0,01/0,1 /1/10µM 1/10µM 300µM 200µM 100nM 200µM 100nM	5h	Augmentation dose-dépendante de la production du NO + augmentation de l'expression de la iNOS. Pas d'effet sur la production du NO. Inhibe la production du NO induite par le Nébivolol. Pas d'inhibition de la production du NO induite par le Nébivolol.	L'action du Nébivolol est dépendante des récepteurs β3 et de la eNOS, et induit une augmentation de l'expression de la iNOS.

Références	échantillon	Traitements	Doses	Temps	Résultats	Conclusions
Kakoki et al., 1999	Anneaux d'aortes de rats **et** Reins de rats isolés et perfusés	Bopindolol Céliprolol Nébivolol 8-OH-DPAT(contrôle +) (agoniste des récepteurs 5-HT1A) - Endothélium L-NAME E-4021 (inhibiteur de cGMP-phosphodiestérase) NAN-190 Métergoline (antagoniste de 5-$HT_{1/2}$) NAN-190 (antagoniste de 5-HT_{1A})	1µM 100µM 10µM 0,01/0,1/ 1µM 100µM 0,01µM 1µM 1µM 1µM	10min	Vasorelaxation et augmentation de la production du NO. Vasorelaxation dose-dépendante, avec très peu d'augmentation dans la production du NO. Inhibition de la vasorelaxation et de la production du NO induite par le Bopindolol, Céliprolol ou Nébivolol.	L'action vasodilatatrice des β bloquants est dépendante des récepteurs 5-HT, la eNOS et la voie de la GC.

Tels que le montrent ces tableaux, le Nébivolol possède une action vasodilatatrice via une action sur les CE en augmentant leur production en NO. Plusieurs études ont tenté d'élucider les mécanismes cellulaires impliqués dans cette action vasodilatatrice. Les principales voies ciblées sont celles impliquées dans la régulation de la production de NO, à savoir la eNOS, le complexe Ca^{+2}/calmoduline et la voie des récepteurs β3 adrénergiques.

VIII- But de l'étude

Le Nébivolol est un β bloquant utilisé dans le traitement de l'HTA. Les recherches du mécanisme de son action thérapeutique sont nombreuses, se focalisant essentiellement sur les récepteurs adrénergiques et sur la voie de signalisation activant la eNOS. Selon la littérature, le mode d'action du Nébivolol consiste en l'augmentation de la production de NO par les CE. Ceci dépend, selon la majorité des auteurs, de l'activation des récepteurs β3 et de la eNOS. Certains auteurs ont même rapporté l'implication de la voie des PKB (protéines kinases B) (PI3K et Akt) (Kakoki et al., 1999 ; Broeder et al., 2000 ; Parenti et al., 2000 ; Gosgnach et al., 2001).

Parallélement, la production de NO a été rapportée comme dépendante de la structure du cytosquelette d'actine. Nous avons de ce fait pensé qu'une molécule à effet hypotenseur telle que le Nébivolol, dont l'action implique l'augmentation de la production de NO, pourrait impliquer le cytosquelette d'actine dans son mode d'action. Dans ce travail, nous avons justement pour but d'étudier l'implication des filaments d'actine du cytosquelette dans le mode d'action du Nébivolol, puis d'évaluer son impact sur l'activité de la eNOS.

Dans un premier temps, nous avons souhaité effectuer l'étude en présence et en l'absence de cisaillement afin de nous rapprocher des conditions physiologiques. Nous nous intéresserons à la réorganisation du cytosquelette d'actine sous contraintes de cisaillement dans le but d'en choisir un modèle adéquat à notre étude. Nous procéderons ensuite au choix de la concentration du Nébivolol pour la suite des travaux. A la suite de quoi, l'effet de cette concentration sera évalué sur l'éventuelle induction de stress oxydatif (HO-1), puis par rapport à la réorganisation du cytosquelette d'actine (paramètres d'orientation et d'élongation cellulaire), à la production des nitrites et à la localisation intracellulaire de la eNOS.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons de plus près à l'implication du cytosquelette d'actine dans le mode d'action du Nébivolol. Nous éluciderons l'implication de la eNOS ainsi que de la Akt via l'évaluation de l'impact des changements structuraux du cytosquelette d'actine sur l'activité de ces enzymes par des techniques d'immunofluorescence, de western blotting et de dosage des nitrites. Afin de nous assurer que la production de NO induite par le Nébivolol provient bien de l'activation de la eNOS, nous avons évalué l'éventuelle expression de la iNOS (seule autre isoforme des NOS susceptible de produire NO dans les EC) dans les CE cultivées en présence de Nébivolol en utilisant une cytokine inflammatoire (TNFα) comme témoin positif.

Dans le but de nous rapprocher des travaux présents dans la littérature, nous étudierons ensuite l’implication des récepteurs adrénergiques β3 susceptibles d’intervenir dans la phosphorylation de la eNOS. L’étude sera effectuée à l’aide d’un antagoniste spécifique de ces récepteurs, dont l’effet sera évalué sur la production des nitrites induite par le Nébivolol.

Enfin, nous évaluerons l’implication du cytosquelette d’actine sur la régulation de la production de NO. Nous nous focaliserons essentiellement sur le phénomène du feed-back négatif qui, selon la littérature, serait déclenché par NO lui-même, entraînant l’augmentation de l’expression des fibres de stress qui serait à l’origine de l’inhibition de la eNOS, et donc de la diminution de la production de NO. Pour ce faire, nous utiliserons des agents perturbateurs des filaments d’actine (cytochalasine D et hydroxyfasudil, ce dernier étant un inhibiteur de la Rho-kinase). Après avoir mis au point les concentrations adéquates, choisies en fonction de leur efficacité à endommager le cytosquelette d’actine sans pour autant induire une nécrose cellulaire, l’effet sera évalué sur la production des nitrites en présence ou non de Nébivolol ainsi que sur la localisation intracellulaire de la eNOS qui détermine son activité.

Chapitre II

Matériels et méthodes

I- Choix et culture des cellules endothéliales

Les cellules choisies pour effectuer cette étude sont des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) obtenues à partir de cordons ombilicaux humains frais fournis par la Maternité Régionale de Nancy. En raison de leur relative facilité d'obtention, ces cellules sont largement utilisées dans la littérature comme modèle expérimental, notamment dans de précédentes études effectuées sur le Nébivolol. De plus, elles présentent l'avantage des cultures primaires, qui est la grande diversité de la source des cellules. Pour se rapprocher de la clinique, où le Nébivolol est prescrit à des personnes différentes, il est recommandé d'évaluer son effet sur des cellules provenant de personnes différentes. La principale limite de ce modèle cellulaire est que les cellules ne sont pas issues de patients hypertendus. Au final, les HUVEC sont un bon modèle pour approcher les mécanismes cellulaires impliqués dans l'effet hypotenseur du Nébivolol. Leur mise en culture a été effectuée selon la méthode de Martin et al., (2001).

I.1- Réactifs et matériels

I.1.1- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un mélange à parties égales de deux milieux. Ils contiennent des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, des sels minéraux, des vitamines et du glucose.

- M199 (Gibco BRL, réf. 31150-030, Lift technologie, France).
- RPMI 1640 (Gibco BRL, réf. 21875-091, Lift technologie, France).

Le milieu complet est constitué de 40% de M199, 40% de RPMI 1640, 20% de sérum humain et d'autres additifs.

Ces additifs, filtrés (0,22µm, Polylabo, Strasbourg, France), puis ajoutés au milieu de base pour former le milieu complet, sont constitués de :

- Acide aminé :
  - L-glutamine (Gibco BRL, réf.25030) 2mM/L
- Antibiotiques :
  - Pénicilline 5000 UI/mL (Gibco BRL, réf.15070) 1%
  - Streptomycine 5000 µg/mL (Gibco BRL, réf.15070) 1%
- Antifungique :

- Fungizone 250 µg/mL (Gibco BRL, réf. 15290) 0,06%

- Sérum humain AB : (UTCT, CHU de Nancy) 20%

Le sérum est décomplémenté à 56°C pendant 30 min.

1.1.2- Tampon de lavage HBSS

HBSS sans Ca^{+2}, ni Mg^{+2} (Hanks balanced saline solution, Sigma, France, réf. H2387).

Ce tampon contient : KCL 0,4 g/L, NaCl 8,0 g/L, KH_2PO_4 0,06 g/L, Na_2HPO_4 0,047 g/L, D-glucose 1,0 g/L, rouge de phénol 0,011 g/L.

Préparation du HBSS liquide :

- L'HBSS (9,5 g) est dissous dans 900 mL d'H_2O distillée à température ambiante (solution A). Le pH est ajusté à 7,2 par $NaHCO_3$ (environ 0,35 g) puis de l'eau distillée est ajoutée (qsp 1L).

I.1.3- Tampon PBS (Phosphate buffered saline)

NaCl :	137mM
KCl :	2,7mM
Na_2HPO_4 :	10mM
KH_2PO_4 :	1,4mM
D-glucose :	1,0g/L

I.1.4- Solution de digestion (Trypsine-EDTA)

- Pour le détachement des cellules de la veine ombilicale, on utilise :

Trypsine-EDTA (Gibco, BRL, France, réf. 25050)	0,25%
EDTA (acide éthylènediaminotétracétique, sel sodique)	0,02%

La solution est préparée dans une solution d'HBSS et conservée à -20°C.

- Pour le détachement des HUVEC des supports de culture, on utilise la solution de digestion précédente diluée au ½ dans du tampon HBSS pour l'amener à la concentration de 0,125%.

I.1.5- Support de cellules en culture

Pour les expérimentations sous contraintes de cisaillement ou non, les cellules sont cultivées sur des lames de verre (70x44 mm, épaisseur 0,19/0,23mm, Polylabo, France, réf. 28784-01).

Préparation des lames

Les lames sont nettoyées avec de l'éthanol 75% puis essuyées afin d'éliminer les résidus de graisse. Elles sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri et stérilisées aux UV pendant 15 min. Les lames sont ensuite revêtues avec 150 µL de solution de gélatine (1% p/v dans H_2O) (Sigma, réf. G1890) et placées à 4°C dans du papier aluminium jusqu'au moment de l'expérience.

I.2. Préparation et culture des HUVEC

I.2.1- Recueil des cordons

Les cordons ombilicaux proviennent de donneurs sains. Une longueur de 15-20 cm est placée dans une boîte de culture de 75 cm^2 contenant 150 mL d'HBSS stérile, et placée rapidement à 4°C. Il est préférable que le cordon soit utilisé le plus rapidement possible. Cependant, il peut se garder 4-6 h à 4°C.

I.2.2 Procédure pour récolter des cellules endothéliales

a) Lavage de la veine ombilicale

L'extérieur du cordon est lavé avec de l'éthanol 75% afin d'éliminer les résidus de sang et autres sécrétions. Un robinet relié à une seringue est fixé à l'un des orifices de la veine par une forte ligature. A l'aide de la seringue, l'intérieur de la veine est rincé trois fois avec du tampon HBSS préchauffé à 37°C pour éliminer le sang et faciliter ainsi l'action de la trypsine. L'autre extrémité du cordon sera clampée avec une pince vasculaire.

b) Détachement des cellules

A l'aide de la seringue, le volume interne de la veine est rempli avec 15-20 mL (selon la longueur du cordon) de la solution de digestion préchauffée à 37°C. Le cordon est plongé dans du tampon HBSS et placé à 37°C pendant 15 min. A la suite de quoi, le cordon est retiré,

posé sur une boîte de Pétri et massé doucement quelque secondes pour bien décrocher les cellules. L'extrémité du cordon est déclampée et la solution de digestion contenant les cellules est recueillie dans un falcon de 50 mL contenant 10 mL de milieu complet pour arrêter l'action de la trypsine. La veine est lavée trois fois avec 10 mL de tampon HBSS pour bien récupérer toutes les cellules, puis la suspension cellulaire est centrifugée à 400g pendant 10 min. Après élimination du surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 1mL de milieu complet puis ensemencées dans des boîtes de culture de 25 cm^2, qui sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C (5% de CO_2 et 95% d'air). Après 24h de culture, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon HBSS afin d'éliminer les cellules sanguines non adhérentes telles que les hématies.

I.2.3- Evolution et entretien de la culture

L'examen au microscope inversé à contraste de phase renseigne sur l'adhésion des cellules endothéliales au fond de la boîte, qui très rapidement se développent sous forme de nombreux îlots. D'une façon générale, les cellules arrivent à confluence au bout de 4-5 jours. Le milieu de culture est changé tous les deux jours pour conserver le spectre d'action des antibiotiques, et renouveler l'apport en facteurs de croissance et en nutriments.

I.3 Passage en subculture

I.3.1 Détachement des HUVEC

A confluence, les cellules sont lavées une fois avec 5 mL de tampon HBSS préchauffé à 37°C. Le détachement des cellules se fait en laissant agir 5 mL de trypsine-EDTA (0,125%) pendant 3 min à 37°C. La digestion est arrêtée par ajout de 5 mL de milieu complet. La suspension cellulaire est centrifugée à 400g pendant 5 min. Les cellules sont ensuite remises en suspension. La numération et l'estimation de la viabilité cellulaire sont alors réalisées.

I.3.2 Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par le test d'exclusion au bleu de trypan. Les cellules sont comptées sur une cellule de Thoma (les cellules colorées en bleu ne sont pas considérées car elles sont mortes). Pour que des cellules soient utilisables, la viabilité cellulaire doit être supérieure à 90%.

- Solution de bleu de trypan

NaCl	4,25% (p/v)	solution A
Bleu de trypan	0,2% (p/v)	solution B
Solution finale	4 volume solution A + 1 volume solution B	

La suspension cellulaire est diluée au demi dans la solution finale de bleu de trypan pour un volume final de 50 µL. Après homogénéisation, cette suspension remplit les deux chambres de la cellule de Thoma. Les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope optique (N1 et N2) pour les deux chambres. La concentration cellulaire **[C]** qui exprime le **nombre de cellules/mL** est calculée ainsi : $[C] = [(N1+N2)/2] * 2 * 10^4$.

I.3.3 Culture sur lames de verre

Pour toutes nos expériences, seules des cellules en deuxième passage ont été utilisées. En effet, au delà du passage 2, un changement morphologique des cellules est observé, elles perdent leur forme arrondie et présentent des extensions cytoplasmiques traduisant le début d'un phénomène de dédifférenciation. On dépose 10^5 cellules sur chaque lame, qui sont ensuite placées pendant au moins 4h dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2 et 95% d'air pour permettre la sédimentation et l'adhésion des cellules. Ensuite 5 mL de milieu complet sont ajoutés, et les cellules sont incubées pendant 48h, temps nécessaire pour obtenir la confluence.

I.4 Critères d'identification

I.4.1 Aspect morphologique

L'examen morphologique au microscope optique inversé des cellules endothéliales à confluence confirme l'aspect de mosaïque homogène en « pavé de chaussée » caractéristique de ces cellules qui sont polygonales et jointives avec un noyau ovalaire contenant 2 ou 3 nucléoles. A confluence, leur croissance s'arrête par inhibition de contact.

I.4.2 Identification par le facteur von Willebrand

Le facteur von Willebrand (vWF) est caractéristique des CE (Sun et al., 2000). L'identification est effectuée par la visualisation de ce facteur dans le cytoplasme des cellules par immunomarquage fluorescent et observation par microscopie confocale.

II. Stimulations et traitements des cellules

II.1 Stimulation mécanique

Physiologiquement, les cellules endothéliales sont soumises à des forces de cisaillement résultant de l'écoulement sanguin. Il est important, lors de l'étude de la réponse cellulaire à une stimulation biochimique quelconque, de se rapprocher des conditions dynamiques dans lesquels se trouvent ces cellules *in situ*. Dans les vaisseaux sains, deux types de cisaillement sont rencontrés en fonction du calibre et de la distance par rapport au cœur **(cf. Chapitre I ; V.6)**. Dans notre étude, nous avons choisi de soumettre les HUVEC à un cisaillement laminaire continu, en raison du fait que le cisaillement laminaire est caractéristique des vaisseaux sains dépourvus de sténose, et qu'il est continu dans la circulation périphérique (loin du cœur), qui, en clinique contrôle justement la tension artérielle. Dans un premier temps, nous avons procédé à la mise au point d'un modèle de cisaillement, la finalité étant d'obtenir un tapis de cellules allongées et orientées dans le sens du flux telles qu'elles sont rencontrées dans les vaisseaux sanguins. Une fois l'amplitude et le temps de contrainte déterminés, nous avons étudié l'impact de Nébivolol sur ces cellules en conditions dynamiques.

II.1.1 Exposition des cellules aux contraintes de cisaillement

Les cellules ont été exposées à deux amplitudes de cisaillement laminaire continu (1,2 et 2,0 Pa). Chaque amplitude a été appliquée pendant une courte (6h) et une longue durée (24h). Une mesure indirecte de la production de NO, accompagnée d'une étude morphologique des cellules (orientation et élongation cellulaire) par le marquage immunofluorescent du cytosquelette d'actine ont alors été effectuées.

La difficulté rencontrée lors de l'exposition des cellules aux forces de cisaillement est leur décrochement du support de culture. Pour pallier ce problème, nous avons opté pour une augmentation progressive de l'amplitude de cisaillement. Cette méthode n'a été utilisée que pour la contrainte de 2 Pa où le cisaillement a d'abord été de 0,5 Pa puis augmenté d'une amplitude de 0,2 Pa toutes les 5 min pour atteindre 2 Pa. Le contrôle de l'importance du décrochement cellulaire par simple comptage cellulaire a été effectué, il est généralement inférieur à 10%.

Afin de simuler les conditions d'écoulement laminaire, nous avons utilisé une chambre d'écoulement rectangulaire parallèle où les conditions hydrodynamiques sont parfaitement connues.

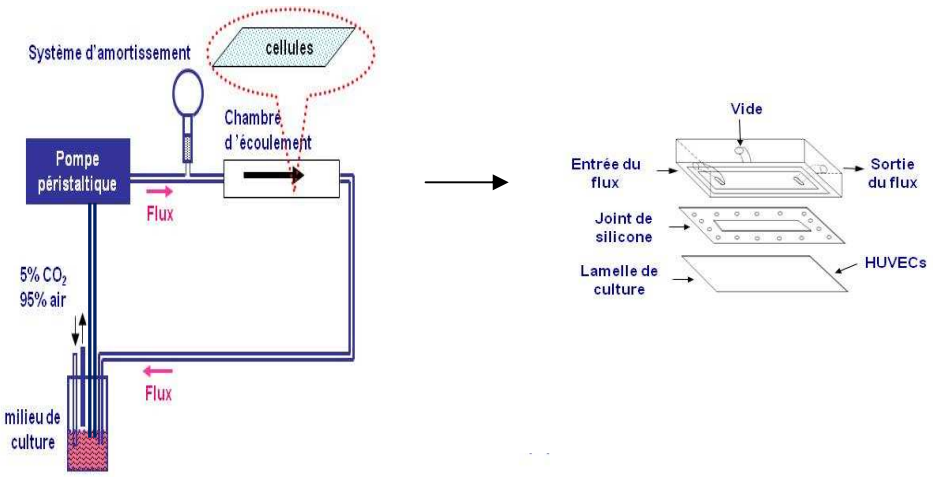
a) Présentation du système de flux :

Le système (figure 14) de cisaillement utilisé *in vitro* pour reproduire le cisaillement physiologique, dont le principe a été mis au point à San Diego par l'équipe de S. Chien, est composé de :

- **Bain marie à 37°C.**
- **Erlenmeyer de 100mL :** réservoir qui contient 30 mL de milieu de culture complet (20% sérum AB), il est placé dans le bain marie. Un mélange gazeux (5% de CO2 et 95% d'air) est introduit dans le réservoir pour maintenir les conditions de culture.
- **Pompe péristaltique (Masterflex, Cole Parmer, USA) :** permet de créer une circulation du milieu de culture et contrôle le débit d'écoulement.
- **3 chambres de flux parallèles en plexiglas :**

  Conçue pour obtenir un flux uniforme et laminaire, la chambre de flux est munie d'une ouverture de 3,2 cm de long et 1,8 cm de large, face à laquelle se place un joint de silicone de 0,024 cm d'épaisseur. Ce système permet une jonction étanche entre la chambre de flux et la lame de verre sur laquelle sont ensemencées les cellules.

- **Pompe à vide :** génère une dépression de 400mbar, responsable de l'adhérence de la lame de verre à la chambre de flux.
- **Tubes en polypropylène :** constituent avec le réservoir un circuit fermé qui alimente les cellules cultivées sur la lame de verre.
- **2 seringues de 5mL :** remplies pour 1/3 de milieu et 2/3 d'air et ajoutées au circuit en amont des chambres. Elles permettent d'amortir, grâce à la compressibilité de l'air, les fluctuations qui parasitent l'écoulement laminaire de la pompe péristaltique.



<u>Figure 14 :</u> schéma du système de culture sous contraintes de cisaillement. Le système est composé d'un réservoir contenant du milieu de culture, d'une pompe péristaltique, d'un système d'amortissement, d'une chambre d'écoulement et des tubes permettant de maintenir un circuit fermé.

b) Calibration du système de flux

Le débit de la pompe péristaltique a été déterminé avec le milieu complet dont la viscosité à été préalablement mesurée à 37°C avec un viscosimètre de type *Couette (*0,78 mPa.s). Cette contrainte exercée sur la monocouche des cellules endothéliales peut être calculée par l'équation suivante :

$$\tau = 6\,Q\,\mu / H^2\,W$$

Q : débit (mL/s)

µ : viscosité du milieu = 0,78 mPa.s

H : hauteur = 0,024 cm

W : longueur de la chambre = 1,8 cm

Les contraintes de cisaillement (τ) utilisées dans nos travaux sont **1,2 Pa** et **2 Pa ;** à ces contraintes correspondent des débits (Q) de **15,95 mL/min** et **26,58 mL/min**.

Le débit de la pompe péristaltique (Masterflex ®, L/S™, model 7519-25, BioblockScientific, France) a été étalonné par la graduation de la vitesse de rotation. Les différents débits ont été obtenus par définition du volume de milieu de culture récolté dans une éprouvette toutes les minutes à différentes graduations de la pompe. Deux mesures ont été effectuées pour chaque graduation et les résultats sont présentés dans le tableau 4 et la figure 15.

Tableau 4 : calibration de la pompe péristaltique par détermination du débit correspondant à chaque graduation.

Graduation	Débit (ml/min)
1	3,6
1,20	6,2
1,40	8,8
1,60	12
1,80	14,5
2	17
2,20	19,5
2,40	22
2,60	24,5
2,80	27,5

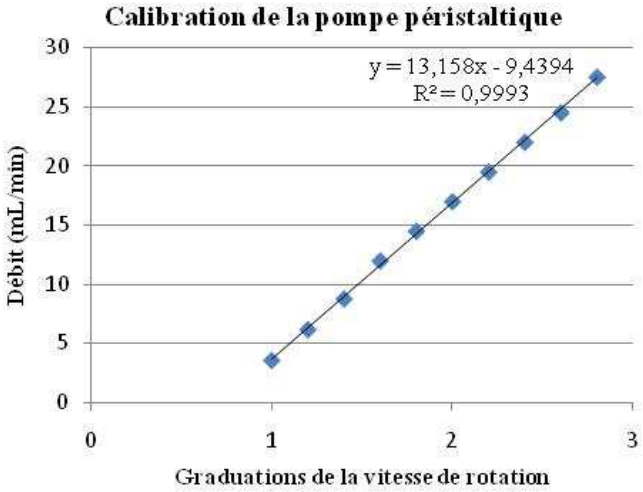


Figure 15 : droite étalon présentant l'évolution du débit (Q) en fonction de l'augmentation des graduations de la pompe péristaltique.

La relation **y = 13,158x – 9,4394** a été obtenue par régression linéaire.

En définitive, ces mesures nous ont permis de définir les graduations sur la pompe péristaltique qui correspondent aux contraintes 1,2 et 2 Pa ayant pour débits 15,95 et 26,58 mL/minute respectivement. Pour les obtenir, on se place aux graduations 1,93 et 2,73 sur la pompe.

II.2 Stimulations biochimiques

II.2.1 Nébivolol

Le Nébivolol (Laboratoires Negma Lerads, France) est un β bloquant cardiosélectif, connu pour son action contre l'hypertension artérielle en augmentant la production de NO par les CE. Comme la plupart des molécules pharmacologiques, le Nébivolol possède un seuil de toxicité qu'il ne faut pas dépasser. Ce seuil est différent si la molécule est administrée à un être humain/un animal ou incorporée dans une culture cellulaire. Pour cette dernière, il était impératif de connaître l'influence de la concentration de Nébivolol sur la viabilité cellulaire, sur une période de 24h, et de chercher d'éventuelles cellules nécrotiques ou apoptotiques. Une fois la concentration choisie, nous avons testé l'effet du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine dans les conditions statiques et sous contraintes de cisaillement. Nous avons ensuite observé l'impact de ce réarrangement sur la production de NO et sur la localisation intracellulaire ainsi que l'expression de la eNOS et la eNOSp.

Préparation de la solution du Nébivolol

- Une solution mère contenant 72,522 mg dissous dans 1 mL de DMSO a été préparée (concentration finale 500 mM). La solution mère a été filtrée puis diluée dans du DMSO aux concentrations suivantes : 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 **mM** ; les dilutions ont été conservées à -20°C.
- Les concentrations finales testées sur les cellules sont : 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 et 500 **µM**.

II.2.2 Etude des perturbations de la structure et la polymérisation du cytosquelette d'actine

Afin de comprendre les mécanismes qui impliquent le cytosquelette d'actine dans l'action du Nébivolol, nous avons agi sur la structure des filaments d'actine en perturbant le processus de polymérisation des monomères G. Pour ce faire, nous avons opté pour deux méthodes : soit l'apport d'un facteur exogène, la cytochalasine D qui agit directement et de façon autonome sur la structure des filaments, soit la perturbation de la voie de signalisation des protéines Rho (Rho-kinase), qui est étroitement liée à la régulation des mécanismes contrôlant la structure des filaments (polymérisation / dépolymérisation).

II.2.2.1 Cytochalasine D

La cytochalasine-D (Sigma, C8273) de formule $C_{30}H_{37}NO_6$ (figure 16) est une toxine connue pour ces propriétés d'inhibition de la polymérisation des fibres d'actine en se fixant sur l'extrémité + du filament, empêchant ainsi l'ajout des monomères d'acine G (cf. chapitre I ; V.5.1). Le filament d'actine étant une structure dynamique caractérisée par une dépolymérisation continue d'un côté (extrémité -) et une polymérisation de l'autre (extrémité +), la fixation irréversible de la cytochalasine D sur l'extrémité + entraîne la dégradation totale du filament, car elle empêche la fixation des monomères d'actine G. Entre autres, l'extrémité – du filament continue à subir une dépolymérisation. De ce fait, une dose inadaptée de cytochalasine D pourrait entraîner trop de dégradation dans le cytosquelette et donc la mort cellulaire et par conséquent, des résultats aberrants. C'est pourquoi nous avons testé plusieurs concentrations sur la viabilité cellulaire avant de procéder à nos tests avec le Nébivolol.

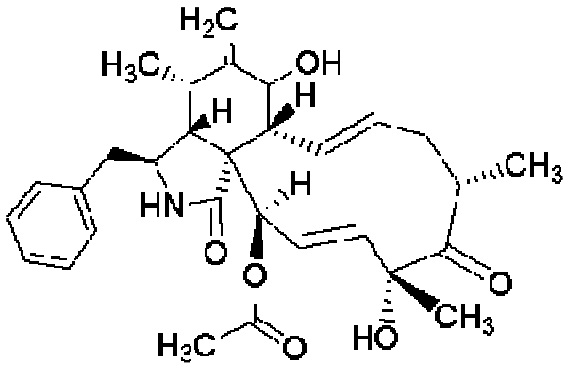


Figure 16 : formule chimique de la cytochalasine D ($C_{30}H_{37}NO_6$) (http://www.sigmaaldrich.com)

Préparation de la solution de cytochalasine D :

- Une solution mère contenant 1 mg de cytochalasine D dissous dans 2 mL de milieu M199 a été préparée (concentration finale : 1mM). La solution est filtrée puis aliquotée et conservée à -20°C.

- Les concentrations testées sur les cellules sont : 5, 10, 20, 50, 100, 200, 1000 nM. La solution mère est diluée dans le volume requis de milieu complet puis ajoutée aux cellules 10 min avant le début de l'expérience.

II.2.2.2 Inhibiteur spécifique de la Rho-kinase

[Hydroxyfasudil : **1-(1-hydroxy-5-isoquéinolinesulfonyl)homopipérazine, HCl ; HA1100**]

L'hydroxyfasudil (Calbiochem, réf. 390602) de formule $C_{14}H_{17}N_3O_3S$. HCl (figure 17), est un inhibiteur spécifique et réversible de la Rho-kinase qui agit comme agent compétitif des ATP. Tout comme pour la cytochalasine D, plusieurs concentrations d'hydroxyfasudil ont été testées sur la viabilité cellulaire avant de procéder aux tests avec le Nébivolol.

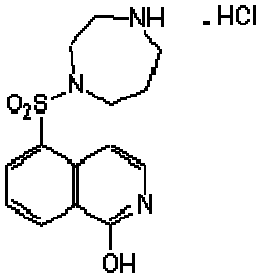


Figure 17 : formule chimique de l'hydroxyfasudil ($C_{14}H_{17}N_3O_3S$. HCl) (http://www.merckbiosciences.co.uk)

Préparation de la solution d'hydroxyfasudil :

- Une solution mère contenant 2 mg d'hydroxyfasudil dissous dans 582 mL d'H_2O (concentration finale 10 mM) est filtrée et aliquotée et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.
- Les concentrations utilisées pour les manipulations sont : 20 µM, 50 µM et 100 µM. Pour obtenir ces concentrations, la solution mère est diluée dans le volume requis de milieu complet.

II.2.3 Inhibition directe de la voie impliquée dans la production du NO

La voie de signalisation la plus connue dans la régulation de la production du NO fait appel à la phosphorylation de la eNOS (Ser^{1177}) par les Akt, eux-mêmes phosphorylés par les PI3-kinases. L'inhibition des Akt ou de la eNOS a été réalisée dans le but de compléter l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans l'action du Nébivolol, et en particulier, établir la relation entre le cytosquelette d'actine et l'activation de la eNOS sous l'action du Nébivolol.

II.2.3.1 Inhibiteur des Akt

(I-Akt : **1L-6-hydroxyméthyl-chiro-inositol 2-®-2-O-méthyl-3-O-octadécylcarbonate**)

L'inhibiteur puissant et sélectif des Akt de formule $C_{30}H_{58}O_{10}$ (Calbiochem, réf. 124005) (figure 18), est un analogue des phosphatidylinositol-éthers, qui exerce cependant un faible effet inhibiteur sur les PI3-kinases.

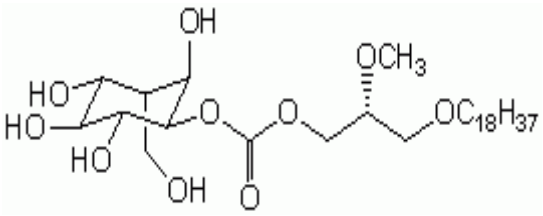


Figure 18 : formule chimique de l'inhibiteur des Akt ($C_{30}H_{58}O_{10}$) (http://www.merckbiosciences.co.uk)

Préparation de la solution d'I-Akt :

- Une solution mère contenant 1 mg d'I-Akt dissous dans une solution composée de 200 µL de DMSO et 800 µL d'H_2O (concentration finale 1720 µM), a été filtrée puis aliquotée et conservéé à -20°C.
- Les concentrations utilisées pour les manipulations sont : 2,5 µM, 5 µM et 7 µM. Pour obtenir ces concentrations, la solution mère est diluée dans le volume requis de milieu complet.

II.2.3.2 Inhibiteur de la eNOS

(L-NAME : **chlorhydrate de NG-nitro-L-arginine méthyl ester**)

L'inhibiteur de la eNOS de formule : $C_7H_{12}N_5O_2$, HCl (Calbiochem, réf. 483125) (figure 19), est un analogue du substrat de l'enzyme (L-arginine) avec une action inhibitrice réversible.

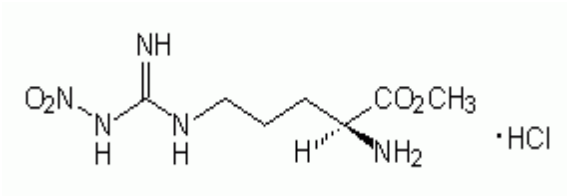


Figure 19 : formule chimique de L-NAME ($C_7H_{12}N_5O_2$) (http://www.merckbiosciences.co.uk)

Préparation de la solution de L-NAME :

- Une solution mère contenant 100 mg de L-NAME dissous dans 2 mL d'H_2O (concentration finale 187. 10^3 µM) a été filtrée puis aliquotée et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.
- Les concentrations utilisées pour les manipulations sont : 50 µM, 150 µM et 300 µM. Pour obtenir ces concentrations, la solution mère est diluée dans le volume requis de milieu complet.

II.2.4 Antagoniste des récepteurs adrénergiques β3

[SR59230A : **oxalate de 3-(2-éthylphénoxy)-1[(1S)-1,2,3,4-tétrahydronapht h-1-ylamino]-(2S)-2-propanol**]

Le SR59230A de formule : $C_{21}H_{27}NO_2$. $C_2H_2O_4$ (Sigma, réf. S8688) (figure 20), est un antagoniste spécifique des récepteurs adrénergiques β3. L'action du Nébivolol sur l'HTA a plusieurs fois été rapportée à son effet agoniste de ces récepteurs. Leur blocage par un antagoniste nous a permis d'évaluer leur rôle dans le mécanisme d'action du Nébivolol.

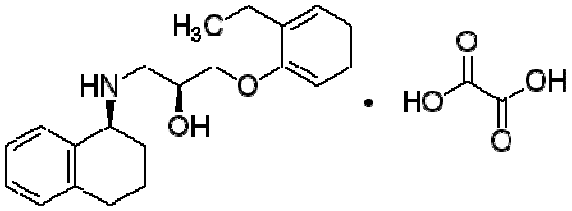


Figure 20 : formule chimique de l'antagoniste des récepteurs β3 (SR59230A) ($C_{21}H_{27}NO_2$. $C_2H_2O_4$) (http://www.sigmaaldrich.com)

Préparation de la solution de SR59230A :

- Une solution mère contenant 5 mg de SR50230A dissous dans 1 mL de DMSO (concentration finale 12 mM), a été filtrée puis aliquotée et conservée à 4°C.
- Les concentrations utilisées pour les manipulations sont : 5 µM, 10 µM et 20 µM. Pour obtenir ces concentrations, la solution mère est diluée dans le volume requis de milieu complet.

II.2.5 TNF-α

Le TNF-α (Sigma Aldrich, réf. T6674) est une cytokine impliquée dans la réponse inflammatoire. Sa production excessive entraîne l'expression de la forme inductible de la NOS et donc une production abondante de NO. Ce dernier, au delà d'une certaine concentration, peut induire un stress oxydatif responsable d'une apoptose. Dans notre étude,

le TNF-α a été utilisé comme contrôle positif pour l'expression de la iNOS dans le but d'évaluer l'éventuelle implication de cette isoforme dans la production de NO induite par le Nébivolol. Pour ce faire, un marquage immunofluorescent de la iNOS a été effectué.

Le TNF-α a également été utilisé comme contrôle positif dans l'étude de l'effet du Nébivolol sur le stress oxydatif. Pour ce faire, un marquage immunofluorescent de la HO-1 a été effectué. La HO-1 est la forme inductible des protéines HO, elle est exprimée dans de nombreux stress, entre autres dans les CE en cas de choc thermique ou toxique.

Préparation du TNF-α

- 10 µg de TNF-α ont été dissous dans 1 mL de RPMI 1640, et les cellules ont été incubées en présence de 10 et 20 ng/mL pendant 24h.

II.2.6 Nitroprussiate de sodium dihydrate (SNP)

Le SNP, de formule : $Na_2[Fe(CN)_5NO]\cdot 2H_2O$ (Sigma Aldrich, réf. 22,871-0) couramment appelé donneur de NO (figure 21), est un composant chimique produisant du NO,. En clinique, le SNP est administré par voie veineuse chez les patients hypertendus. Dans cette étude, le SNP a également été utilisé comme contrôle positif. En effet, puisque NO influence la structure des filaments d'actine, il a été suggéré qu'il contribue à la régulation de sa propre production. La finalité de ce contrôle a été de vérifier les effets apportés par le Nébivolol et le SNP sur le remodelage du cytosquelette d'actine.

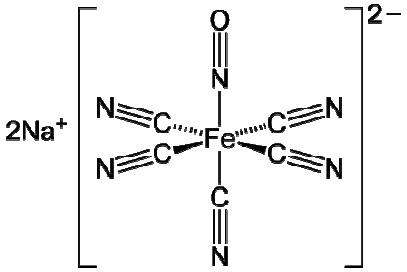


Figure 21 : formule chimique du donneur de NO SNP ($Na_2[Fe(CN)_5NO]\cdot 2H_2O$) (http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_nitroprusside)

Préparation de la solution SNP :

- Une solution mère contenant 50 mg de SNP dissous dans 1 mL de RPMI 1640 (concentration finale 167 mM), a été diluée dans du milieu complet pour obtenir une solution de 100 µM. Cette solution a été filtrée et conservée à 4°C à l'abri de la lumière pendant 24h.

III. Méthodes analytiques

III.1 Fluorescence – Immunofluorescence

Les protéines eNOS, eNOSp, iNOS et HO-1 ont été marquées par immunofluorescence indirecte après stimulation biochimique et/ou mécanique des cellules endothéliales. Le marquage immunofluorescent permet d'observer la translocation de la eNOS entre la région péri-membranaire et la région péri-nucléaire sous différentes conditions de culture, ainsi que l'expression de eNOSp, iNOS et HO-1.

La translocation et la phosphorylation de la eNOS sont des indicateurs de son activité enzymatique et donc de la production du NO. L'expression de la iNOS ou de la HO-1 nous renseigne sur une éventuelle réaction inflammatoire ou un stress oxydatif engendré par les différentes conditions de cultures.

III.1.1 Principe de l'immunomarquage indirect

Des molécules exprimées à la surface ou à l'intérieur des cellules sont spécifiquement reconnues par un anticorps dit : anticorps primaire (AC primaire). Après rinçage, l'excès d'AC primaire est évacué, il ne reste que celui qui s'est fixé. Afin de mettre en évidence la formation du complexe molécule-AC primaire, un deuxième anticorps est utilisé (AC secondaire). Ce dernier est couplé à un fluorochrome et il est spécifiquement dirigé contre l'AC primaire (figure 22). Lorsqu'il est excité par une source laser, le fluorochrome absorbe de l'énergie à une longueur d'onde donnée, puis retourne à son état fondamental en émettant un signal fluorescent qui permet de visualiser et de quantifier la protéine marquée. La technique utilisée dans ce travail est la microscopie confocale.

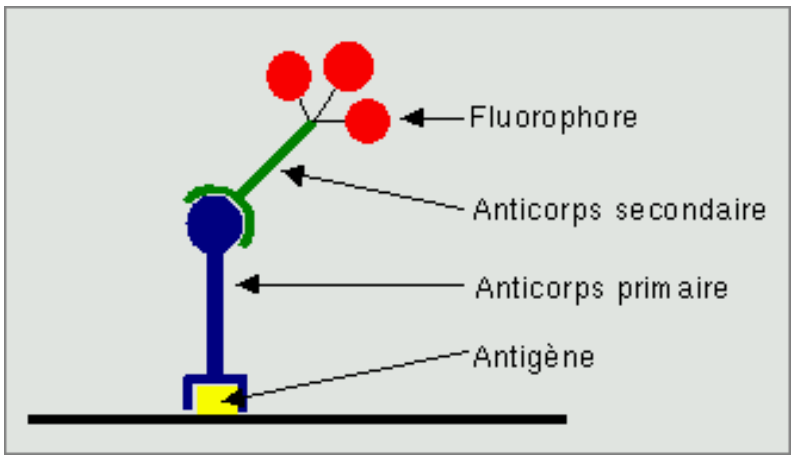


Figure 22 : schéma du principe de l'immunofluorescence indirecte (http://webiologie.free.fr/techniques/marquage/immunomarquage.png)

a) La microscopie confocale

La microscopie de fluorescence en général constitue une avancée technologique majeure dans l'imagerie cellulaire et tissulaire. Les images acquises par microscopie à fluorescence classique présentent une perte de la résolution qui se manifeste par la présence de lumière parasite provenant de l'émission de fluorescence par les fluorochromes situés hors du plan focal. La microscopie confocale (SP2 AOBS-MP, Leica) résout ce problème en utilisant un diaphragme de diamètre très fin appelé *pin-hole*, permettant de collecter uniquement la fluorescence émise dans le plan focal en éliminant la lumière parasite. L'émission de fluorescence est le résultat de l'excitation du fluorochrome par un faisceau laser. Plusieurs sources d'excitation sont disponibles, mais les plus utilisées sont : les lasers argon/krypton (488 nm) et hélium/néon (568-633 nm). Après excitation, la fluorescence est réémise et récupérée par un diaphragme présent à l'entrée du photodétecteur qui récolte uniquement les photons provenant du point excité. Les photons captés sont ensuite amplifiés puis transformés en signaux électriques dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons captés.

Acquisition d'images 3D

La microscopie à balayage laser permet la visualisation des échantillons biologiques en trois dimensions, en fournissant des images de haute résolution. La construction de l'image totale de l'objet nécessite le balayage du faisceau laser point par point à l'aide d'un système constitué de deux miroirs appelés miroirs galvanométriques qui vibrent en x et en y. Le

déplacement en hauteur selon l'axe z est réalisé grâce à une sur-platine (quartz piézo-électrique) faisant varier le plan de mise au point, ce qui permet d'obtenir une série de coupes optiques appelées série z. Pour notre étude, nous avons choisi de faire les images 3D sur 30 plans superposés de l'échantillon. Chaque plan est représenté par une image. Les images sont ensuite empilées et projetées sur un écran conduisant à une image reconstruite en 3D. L'avantage de ce mode d'acquisition consiste en la représentation topographique de l'intensité de fluorescence, considérée comme proportionnelle au nombre de fluorophores. L'intensité de fluorescence a été mesurée par unité de pixel à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (ImageJ). Les mesures ont été faites sur 100 cellules individuelles en prenant en compte toutes les cellules apparaissant sur chaque image (toutes les images ayant la même échelle). Les images sont acquises sur des endroits aléatoires de la surface ensemensée de chaque lame et issues de trois expériences différentes pour chaque condition de culture.

b) Marquage des molécules étudiées

Les caractéristiques des AC polyclonaux dirigés contre les molécules de eNOS, eNOSp, iNOS et HO, vWF ainsi que celles des AC secondaires sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : caractéristiques des anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence indirecte.

Anticorps	Spécificité de l'espèce	Source animale	Origine commerciale
Anticorps anti eNOS	humain	lapin	Santa cruz biotechnology (réf. SC-654)
Anticorps anti eNOSp	humain	chèvre	Santa cruz biotechnology (réf. SC-12972)
Anticorps anti iNOS	humain	souris	Santa cruz biotechnology (réf. SC-7271)
Anticorps anti HO-1	humain	chèvre	Santa cruz biotechnology (réf. SC-1796)
Anticorps anti vWF	humain	souris	Dako (réf. M0616)
Anticorps anti IgG-Alexa fluor® 488 (λ_{ex}: 488 nm, λ_{em}: 519 nm)	chèvre	lapin	Invitrogen (réf. A11078)
Anticorps anti IgG-Alexa fluor® 488 (λ_{ex}: 488 nm, λ_{em}: 519 nm)	lapin	chèvre	Invitrogen (réf. A11008)
Anticorps anti IgG-Alexa fluor® 488 (λ_{ex}: 488 nm, λ_{em}: 519 nm)	souris	chèvre	Invitrogen (réf. A11001)

c) Réactifs

- Solution de fixation PAF (Paraformaldéhyde) (Sigma Aldrich, réf. P-6148) à 1% (p/v) dans du PBS.
- Solution de perméabilisation Triton X100 (Sigma Aldrich, réf. 284467) à 0,5% dans de l'H_2O.
- RPMI 1640-BSA 0,5% (BSA : Albumine Sérique Bovine, Sigma Aldrich, réf. A-9647) utilisée à 0,5% (p/v) dans du RPMI 1640 sans rouge de phénol. La BSA empêche toute fixation aspécifique des AC.

d) Protocole

Après stimulations biochimiques et/ou mécanique, les cellules sont lavées deux fois avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol puis fixées avec 4 mL de PAF 1% pendant 10 min à 37°C. Une perméabilisation avec 4 mL de Triton X100 0,5% pendant 15 min, permet de digérer les phopholipides composant la membrane cytoplasmique, créant ainsi des pores qui permettront l'entrée des AC.

L'AC primaire est dilué au 1:50 dans du RPMI-BSA 0,5% et ajouté aux cellules pendant 1h à température ambiante. Trois lavages sont effectués avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol avant d'incuber les cellules avec l'AC secondaire (dilution au 1:100 dans du RPMI-BSA 0,5%) pendant 45 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin les cellules sont lavées trois fois et sont prêtes à être observées en microscopie confocale.

Deux contrôles négatifs (cellules sans anticorps et cellules incubées avec l'AC secondaire uniquement) ont été effectués aux mêmes temps que les échantillons, afin de prendre en considération une éventuelle auto-fluorescence des cellules ou une fixation aspécifique de l'AC secondaire.

e) Marquages du cytosquelette d'actine et du noyau

Les filaments d'actine sont marqués avec la phalloïdine couplée à un fluorochrome. La phalloïdine est une toxine extraite de l'*amanite phalloïde* (champignon vénéneux), elle se lie à l'interface entre les sous-unités F actine et bloque ainsi les sous-unités adjacentes.

Le marquage des filaments d'actine est donc réalisé en incubant les cellules pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière avec la phalloïdine Alexa® 488 (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 519 nm, Invitrogen, réf. A12379) ou 594 (λ_{ex} = 581 nm, λ_{em} = 609 nm, Invitrogen,

réf. A12381) diluées au 1:100 dans du TritonX100 0,5%. La phalloïdine étant une grosse molécule, la dilution dans le Triton lui facilite le passage à travers la membrane cytoplasmique. Le noyau est marqué soit par l'iodure de propidium (IP) (Molecular probes, réf. P-1304) (λ_{ex} = 543 nm, λ_{em} = nm), soit avec le Hoechst (Sigma-Aldrich, réf. B2261) (λ_{ex} = 346 nm, λ_{em} = 460 nm).

L'utilisation de deux types de marquage pour le cytosquelette (phalloïdine Alexa® 488 ou 594) et le noyau (l'IP ou Hoechst) nous a permis de visualiser trois types de marquage au même temps (eNOS, cytosquelette et noyau) par exemple :

- eNOS ou eNOSp marqué avec AC secondaire Alexa® 488 (dans le vert).
- Cytosquelette marqué avec phalloïdine Alexa® 594 (dans le rouge).
- Noyau marqué avec du Hoechst (dans le bleue).

Dans le cas où seulement le cytosquelette et le noyau ont été marqués, nous avons utilisé la phalloïdine Alexa® 488 et l'IP.

Les cellules fixées et marquées peuvent être conservées quelques jours à 4°C et à l'abri de la lumière. L'intensité de la fluorescence est observée par microscopie confocale (Confocal Laser Scanning microscope, SP2 Leica, Germany).

III.1.2 Méthodes d'analyse des images 3D acquises par microscopie confocale

Caractérisation des indices d'élongation et angles d'orientation des cellules

Afin d'étudier l'effet du Nébivolol et/ou des forces de cisaillement sur la restructuration du cytosquelette d'actine qui correspond à des modifications structurales résultant de la polymérisation/dépolymérisation de ses filaments, ainsi que le sens de leur orientation en réponse à une stimulation externe, nous avons évalué, grâce à un logiciel de traitement d'image (ImageJ), l'évolution des paramètres qui découlent de ce remodelage, comme l'indice d'élongation et l'angle d'orientation des cellules. L'évaluation de ces paramètres a été effectuée sur des images 3D obtenues à partir de cellules dont le cytosquelette d'actine a été marqué.

- **L'indice d'élongation** est le rapport entre le petit et le grand axe de la cellule. Lorsqu'il est compris entre 0 et 0,5, la cellule est allongée, et lorsqu'il est compris entre 0,5 et 1, la cellule est arrondie.

- **L'angle d'orientation** correspond à l'angle que délimite le grand axe de la cellule avec l'angle 0° à l'horizontale. Dans le cas où les cellules sont soumises à une contrainte de cisaillement, celle-ci est perpendiculaire (figure 23).

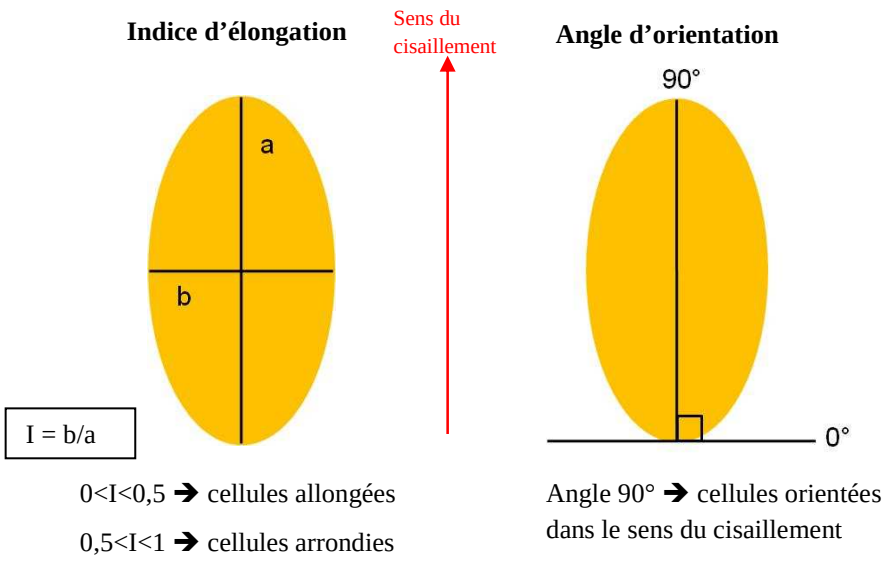
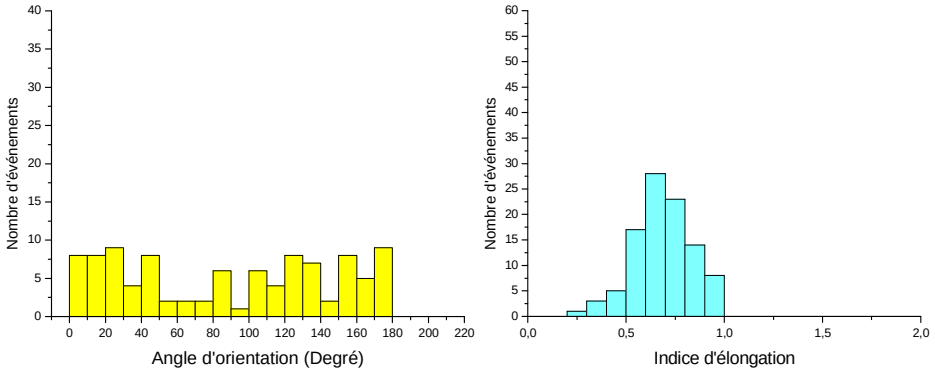


Figure 23 : méthodes d'analyse de l'angle d'orientation et de l'indice d'élongation des cellules après marquage du cytosquelette d'actine.

Cette analyse repose sur 100 cellules. Toutes les cellules de chaque image sont prises en compte. Les images sont acquises à la fin de chaque expérience sur des champs aléatoires de la surface ensemencée de la lame et issues de trois expériences différentes pour chaque condition de culture. Le cytosquelette d'actine de chaque cellule est individuellement segmenté par un curseur pour en préciser le contour, qui est ensuite ajusté par une ellipse dont le logiciel calcule les paramètres d'élongation et l'orientation. Les valeurs ainsi obtenues sont exploitées à l'aide d'un logiciel informatique (Microcal Origin 6.0) où les résultats sont exprimés sous formes de cytogrammes représentant l'indice d'élongation ou l'angle d'orientation des cellules en fonction du nombre d'événements (figure 24).



<u>Figure 24 :</u> cytogrammes exprimant les angles d'orientations (à gauche) et les indices d'élongation (à droite) en fonction du nombre d'événements exploités avec le logiciel «Microcal Origin 6.0».

III.2 Mesure de la production de NO

Dès sa production, NO est oxydé en nitrites et nitrates. Nous avons donc effectué une mesure indirecte de cette production via la quantification des nitrites dans le milieu de culture.

<u>Mesure indirecte</u>

La mesure indirecte de la production de NO a été effectuée en parallèle au marquage immunofluorescent de la eNOS et la eNOSp pour toutes les conditions de culture. 1 mL de milieu complet est prélevé à la fin de chaque expérience et peut être conservé à -20°C pendant plusieurs semaines. Au moment des dosages, les milieux sont décongelés à température ambiante. Le volume de milieu sur lequel sont effectuées les mesures est de 150µL, le réactif de Griess détecte la présence des nitrites dans le surnageant à partir de 1µM.

<u>Matériel :</u>

- Kit de Griess (Molecular probes, réf G-7921), composé de :
    - N-(1-naphtyl) éthylènediamine dichlorohydrate (composant A).
    - Acide sulfanilique (composant B).
    - Solution standard de nitrite (composant C).
- Plaque de 96 puits.

Principe :

Cette méthode permet par la réaction de Griess, le dosage des nitrites formés par l'oxydation spontanée de NO. Cette méthode repose sur la conversion de l'acide sulfanilique en sel de diazonium par les nitrites présents dans la solution. Le sel de diazonium est ensuite couplé au N-(1-naphtyl)éthylènediamine, formant un composé coloré qui peut être quantifié par photométrie à 548 nm (figure 25).

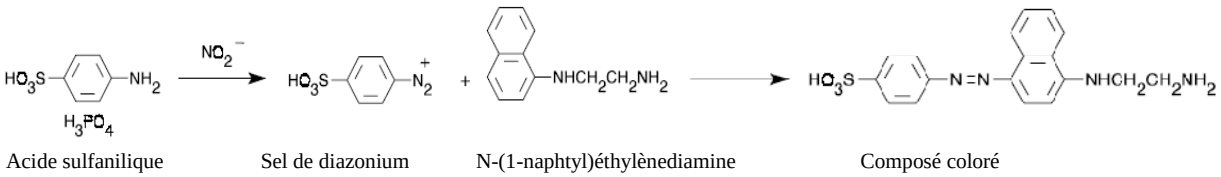


Figure 25 : principe de quantification des nitrites par la réaction de Griess.

Protocole :

Un volume égal des composants A et B est mélangé pour former le réactif de Griess. Dans une plaque de 96 puits, on dépose dans chaque puits 150 µL d'échantillon prélevé sur le milieu complet ayant servi pour chaque expérience, 130 µL d'H_2O désionisée et 20 µL de réactif de Griess. Une droite étalon est préparée avec le composant C pour obtenir les concentration de nitrites suivantes : 100/ 50/ 25/ 12,5/ 6,25/ 3,125/ 1,5/ 0,75 µM. Après un temps d'incubation de 30min à l'abri de la lumière, l'absorbance est déterminée avec un densitomètre (Bio-rad, Model 680 microplate reader) en utilisant le logiciel Microplate Manager.

III.3 Etude de l'expression de la eNOS et la eNOSp par Western blotting

III.3.1 Principe du Western blotting

Le western blotting permet de doser les protéines spécifiques issues de cellules ou d'un tissu. La quantification de l'expression de la eNOS et de la eNOSp constitue un apport très important dans cette étude. Cette technique se déroule en cinq étapes :

a) Extraction des protéines totales à partir de cellules lysées.

b) Séparation des protéines totales grâce à une électrophorèse. La migration des protéines dans un gel de polyacrylamide est proportionnelle à leur masse moléculaire.

c) Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.

d) Mise en évidence des protéines recherchées grâce à un immunomarquage indirect.

e) Révélation de l'interaction de l'AC avec la protéine recherchée grâce à une technique de chimiluminescence.

II.3.2 Protocoles expérimentaux

II.3.2.1 Lyse des cellules

Tampon de lyse

- Tris 50mM pH 7,5
- NaCl 150mM
- Nonidet P-40 1% (v/v)
- Déoxycholate 0,5% (p/v)
- Dodécyl sulfate de sodium (SDS) 0,1%
- Cocktail de protéases inhibitrices 1% (v/v) pH 7,5

Les cellules sont rincées deux fois avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol à 37°C. Après aspiration de l'excès du RPMI, 100 µL de tampon de lyse sont ajoutés. Aussitôt les cellules sont décrochées et transférées dans des microtubes puis incubées 10 à 15min à 4°C. Les lysats cellulaires sont centrifugés à 12000 tour/minute pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales est transféré dans de nouveaux microtubes.

II.3.2.2 Dosage des protéines

Réactifs de dosage :

- Bio-rad D_C Protein Assay Reagent
  - Reagent A (réf. 500-0113)
  - Reagent S (réf. 500-0115)
  - Reagent B (réf. 500-0114)

- La concentration des protéines est déterminée grâce une réaction colorimétrique qui consiste en premier lieu à préparer une gamme étalon de sérumalbumine bovine dans le tampon de lyse aux concentrations suivantes : 0 / 0,2 / 0,75 / 1 / 1,25 / 2 mg/mL. Un mélange de réactifs S et A dans un rapport 1 / 50 est préparé pour obtenir une solution A', celle-ci est ajoutée aux échantillons ainsi qu'à la gamme d'albumine dans un rapport de 1/5. Ensuite, la solution B est ajoutée dans un rapport de 1/40. Enfin l'absorbance est mesurée à 750 nm après 15 minutes d'incubation à l'abri de la lumière avec le densitomètre (Bio-rad, Model 680 microplate reader) en utilisant le logiciel Microplate manager.

II.3.2.3 Electrophorèse

Gels d'électrophorèse

Gel de séparation d'acrylamide à 10% (20 mL)

- H_2O 8,2 mL
- Bis-acrylamide à 30% 6,6 mL
- Tris-HCl pH 8,8 1,5 mM 5 mL
- SDS 10% (p/v) 0,2 mL
- Persulfate d'ammonium 10% (p/v) 100 µL
- TEMED 4 µL

- Le gel encore liquide remplit les ¾ de la plaque puis est recouvert d'H_2O afin de le tasser. La polymérisation dure 45 min.

Gel de concentration d'acrylamide à 5% (5 mL)

- H_2O 3,4 mL
- Bis-acrylamide à 30% 0,83 mL
- Tris-HCl pH 6,8 1,5mM 0,63 mL
- SDS 10% (p/v) 0,05 mL
- Persulfate d'ammonium 10% (p/v) 50 µL
- TEMED 5 µL

- Ce gel remplit le dernier ¼ de la plaque, un peigne est placé afin de déterminer les puits et la polymérisation dure 45 min.

Tampons

Tampon d'électrophorèse 10X

- Tris 50 mM
- Glycine 250 mM
- SDS 0,1% (p/V)

- Le tampon est dilué au 1 :10 dans l'H_2O pour obtenir un volume total de 500 mL.

Tampon de charge SDS

- Tris-HCl 50 mM
- Glycérol 10% (p/v)
- SDS 2% (p/v)
- Bleu de Bromophénol 2% (p/v)
- Dithiothréitol 100 mM

Un volume suffisant d'une solution composée de β-mercaptoéthanol (réduit les ponts disulfure lors de la dénaturation des protéines) et de tampon de charge (composé bleu qui permet de suivre la migration sur le gel) est préparé dans un rapport de 1/19. Cette solution est mélangée à volume égal à celle contenant les protéines totales, puis portée à ébullition pendant 3 min afin de dénaturer les protéines pour leur permettre de migrer dans les mailles du gel une fois déposées.

Pour la migration, le tampon d'électrophorèse est versé entre les deux plaques jusqu'à remplir le vide, le reste du tampon sert à remplir la cuve à moitié. Les protéines migrent sur les gels pendant 30 min à 80 volts (jusqu'à ce qu'elles arrivent à l'extrémité du gel de concentration), puis pendant 1h à 100 volts.

II.3.2.4 Transfert

Tampon de transfert

- Tris 25mM
- Glycine 190mM
- MeOH 20% (v/v)
- SDS 0,05% (p/v)

Ajuster le pH à 8,3

Membrane PVDF (difluorure de polyvinylidène, Bio-rad, réf. 162-0177).

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF préalablement humidifiée dans du méthanol pur. Le montage est préparé comme le montre la figure 26. Il consiste à placer le gel et la membrane PVDF entre deux papiers filtres (Bio-rad, réf. 165-0962) puis le tout entre deux mousses (les papiers filtres et les mousses sont humidifiés avec du tampon de transfert). La cassette est soigneusement fermée et placée dans le bac contenant le tampon de transfert. Enfin, les protéines sont transférées pendant 2h à 100 volts et à 4°C.

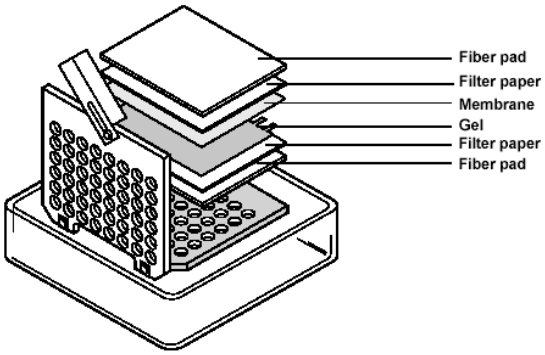


Figure 26 : montage de transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane PVDF. Le gel et la membrane sont placés entre deux papiers filtres qui sont eux-mêmes placés entre deux mousses. Le tout est mis à l'intérieur d'une cassette soigneusement fermée et plongée dans le tampon de transfert.

II.3.2.5 Marquage

Tampon de blocage

- Tris 10 mM, PH 7,5
- NaCl 100 mM
- Tween20 0,1% (v/v)
- BSA 1% (p/v)

Ajuster le pH à 7,5.

Une fois le transfert terminé, la membrane est plongée dans environ 2 mL de tampon de blocage et incubée pendant 1h sous légère agitation ; à la suite de quoi elle est incubée toute la nuit à 4°C avec l'AC primaire [lapin anti eNOS (cell signaling, réf. 9572) ou lapin anti eNOSp (cell signaling, réf. 9571)], dilués au 1 :5000 dans du tampon de blocage + 5% de BSA sous agitation. Un second rinçage (3 fois pendant 10 min), est suivi par l'incubation de la membrane avec l'AC secondaire de chèvre anti lapin conjugué à l'HRP (Bio-rad, réf. 170-6515) dilués au 1 :10000 dans du tampon de blocage + 5% de BSA pendant 1h sous agitation. Un troisième rinçage est réalisé avant de procéder à la révélation.

Les protéines sont quantifiées relativement à l'expression d'une protéine ubiquitaire GAPDH (Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase) qui est une enzyme catalysant une étape de la glycolyse aboutissant à la synthèse d'une molécule de NADH (nicotinamide-adénine-dinucléotide). Cette protéine à été choisie car son expression n'est pas influencée par les conditions de culture pour lesquelles elle a été utilisée, à savoir Nébivolol, LNAME « inhibiteur de eNOS », I-Akt « inhibiteur de Akt » et hydroxyfasudil « inhibiteur de la Rho-kinase ». La GAPDH a été marqué avec l'AC primaire anti GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, réf. sc-25778) dilué au 1 :5000 dans du tampon de blocage + 5% de BSA et l'AC secondaire chèvre anti lapin conjugué à l'HRP (Bio-rad, réf. 170-6515) dilué au 1 :10000 dans du tampon de blocage + 5% de BSA.

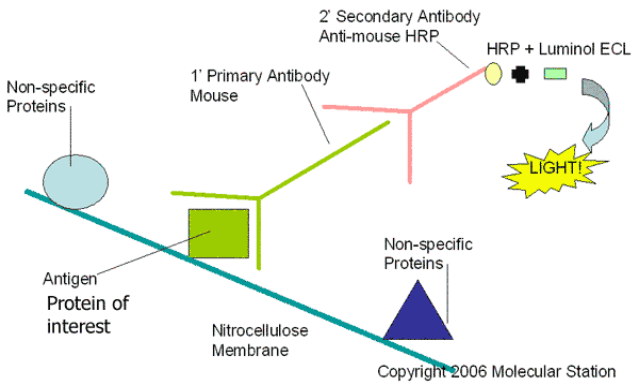
II.3.2.6 Révélation par chimiluminescence

Réactifs

- Kit de detection : "ECL plus" western blotting detection (Amersham, réf. RNP2132)

Principe de la technique

La luminescence est définie comme étant l'émission de lumière résultant d'une dissipation d'énergie à partir d'une substance à l'état excité. Enhanced chimiluminescence ou ECL est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse du western blotting. Dans la chimiluminescence, l'excitation d'une substance est due à une réaction chimique. L'HRP (Hydrogen Peroxide) couplé à l'AC secondaire, catalyse l'oxydation du luminol (composant du kit de détection) dans des conditions alcalines. Le luminol à l'état excité, retourne à l'état fondamental en émettant une lumière (figure 27) qui est détectée grâce à un appareil de luminescence LAS4000 (Luminescence analyser System) et les bandes obtenues sont analysées par le logiciel « Multi gauge » qui évalue le taux relatif de marquage de la protéine et quantifie les résultats en terme de densité optique.



<u>Figure 27 :</u> schéma représentant l'exploitation de la chimiluminescence dans la révélation des protéines dans le western blotting. L'HRP couplé à l'AC secondaire catalyse l'oxydation du luminol contenu dans le kit de détection. Ce dernier est alors dans un état excité. Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière (http://www.molecularstation.com/images/western-blot.gif).

<u>Protocole</u>

Les membranes sont incubées pendant 3 minutes à l'abri de la lumière avec un mélange des deux réactifs d'ECL plus dans un rapport de 1/40, à raison de 125 µL/cm^2. Après élimination de l'excès de solution, les membranes sont enveloppées dans un film plastique transparent et placées dans l'enceinte de l'appareil LAS4000. Plusieurs essais de temps de révélation nous ont mené à le fixer à 20 secondes, car c'est le temps nécessaire pour l'apparition des bandes sans qu'il y ait saturation. Enfin, la mesure de la densité optique des bandes a été faite avec le logiciel « Multi gauge ».

III.4 Evaluation de la cytotoxicité (nécrose cellulaire)

<u>Matériel</u>

Vibrant® apoptosis Assay kit #2, Invitrogen, Molecular probes, France, réf. V13241)

Le kit contient :

De l'Alexa Fluor® 488 annexine V, de l'iodure de propidium (IP) et du tampon d'incubation 5X.

Principe

Lors de la nécrose cellulaire, les membranes plasmiques et nucléaires perdent leur intégrité et donc leur imperméabilité. L'iodure de propidium (IP) est utilisé pour détecter les cellules nécrotiques, c'est à la fois un agent intercalant de l'ADN et une molécule fluorescente. Il ne peut rentrer dans la cellule que lorsque celle-ci est morte. De ce fait les cellules dont les noyaux ne sont pas marqués seront considérées comme viables.

Protocole

Dans un lab-tek à 8 chambres (Nalge Nunc International, réf. 155409), 10^5 cellules sont ensemencées puis incubées pendant 48h à 37°C et 5% CO_2. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24h avec les différentes concentrations de Nébivolol, cytochalasine D ou hydroxyfasudil dont nous voulons évaluer la cytotoxicité. Après avoir été lavées avec du RPMI 1640 sans rouge de phénol, les cellules sont incubées pendant 15 min à 37°C et 5% CO_2 avec de l'iodure de propidium dilué au 1 :1000 dans du tampon 1X. Enfin, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon 1X puis observées par microscopie confocale.

IV. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type pour chaque condition étudiée. Une analyse de variance a été faite avec comparaison des échantillons témoins par un test *a postériori* PLSD de Fisher (Statview IV®, Abacus Concept Inc., Berkley, CA, USA). Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05% ont été considérées comme significatives.

Chapitre III

Résultats et discussions

L'HTA est une maladie cardiovasculaire fréquente dans les sociétés modernes. De nombreuses études ont porté sur les mécanismes cellulaires à l'origine de cette maladie. Les recherches montrent qu'un bon nombre de ces perturbations sont liées à un dysfonctionnement de la balance de production des agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Ces troubles agissent directement sur la rigidité de la paroi artérielle qui est l'une des causes de l'HTA. Il existe de nombreux traitements pharmacologiques contre l'HTA ; les médicaments, quel que soit leur mode d'action, ont pour rôle commun de réduire la pression à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Le Nébivolol, β bloquant cardiosélectif, abaisse la pression artérielle suite à une augmentation de la production de NO par les CE. Les β bloquants sont des médicaments utilisés en cardiologie qui bloquent l'action des médiateurs du système adrénergique en prenant la place de ces derniers sur les récepteurs β. Plusieurs travaux de recherche ont été menés afin d'éclaircir les différents acteurs et mécanismes cellulaires impliqués dans son action thérapeutique.

Dans cette étude, nous cherchons à élucider le rôle potentiel du cytosquelette d'actine dans la voie d'action du Nébivolol. Dans ce but, nous avons entrepris différents types d'expériences après la mise au point de nombreuses et indispensables conditions expérimentales. La première partie du travail a été consacrée à la mise au point du modèle de culture cellulaire dans les conditions **dynamiques (cisaillement)** ou **non (statique)**, ainsi qu'au choix de la concentration optimale de Nébivolol. La deuxième partie consiste en l'étude de l'effet du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine en conditions statiques ou sous contraintes de cisaillement. Enfin, l'étude plus approfondie du mécanisme cellulaire et des protéines impliquées dans l'action du Nébivolol, essentiellement la eNOS, la Akt et les récepteurs adrénergiques β3, a été menée, mais dans ce cas uniquement en conditions statiques.

Partie I

Mise au point du modèle de culture

La mise au point d'un modèle de culture dans les conditions dynamiques répond à trois critères : la caractérisation phénotypique des cellules utilisées, le choix d'une densité cellulaire appropriée et enfin celui de l'amplitude et du temps d'application des contraintes.

La caractérisation phénotypique des CE au deuxième passage s'est faite grâce au marquage immunofluorescent du facteur von Willebrand (vWF) en raison de sa présence spécifique dans les CE matures. Concernant la densité cellulaire, le stade de confluence s'avère avoir un lien direct avec l'activité de la eNOS (Kondrikov et al., 2006). Les cellules pré-confluentes présentent une carence de production de NO. En revanche les cellules confluentes qui sont alors quiescentes, retrouvent une production optimale. Ainsi, pour pouvoir étudier la production de NO, il faut que les cellules aient une production stable. Nous travaillerons donc avec une monocouche de CE à confluence.

Pour le modèle de contraintes de cisaillement, nous recherchons l'amplitude et le temps nécessaires à l'obtention d'une monocouche de CE orientées et allongées dans le sens du flux comme dans les artères, afin de mimer au mieux les conditions physiologiques. Ceci a été réalisé par l'étude de la réorganisation du cytosquelette d'actine, qui reflète la morphologie des cellules.

Dans cette partie, nous avons également étudié l'effet des différentes contraintes de cisaillement sur la production des nitrites par les CE. Les résultats obtenus sur le réarrangement ainsi que sur la production des nitrites, nous ont permis de valider sur notre modèle des conclusions émises par d'autres équipes de recherche, à savoir l'implication du réarrangement du cytosquelette d'actine dans l'activité de la eNOS.

I.1 Caractérisation phénotypique des cellules et choix de la densité d'ensemencement

Un contrôle phénotypique est réalisé sur des cellules en 2ème passage ensemencées sur une lame de verre recouverte de gélatine puis incubées pendant 48h à 37°C grâce au facteur vWF. L'observation en microscopie confocale à balayage laser montre l'expression cytoplasmique du vWF (figure 28). On peut donc en déduire que les cellules en 2ème passage après 48h de culture ont conservé leur phénotype endothélial, et peuvent, pour cette raison, être utilisées pour la suite de nos travaux.

La valeur de la densité d'ensemencement que nous avons choisie est basée sur des travaux du laboratoire (thèses : Boura. 2003, Ley. 2004) et nous avons retenu une densité de 10^5 cellules/lame ensemencées sur une surface de 2 cm^2 de cette dernière qui, après 48h d'incubation, permet d'obtenir une monocouche de cellules à confluence.

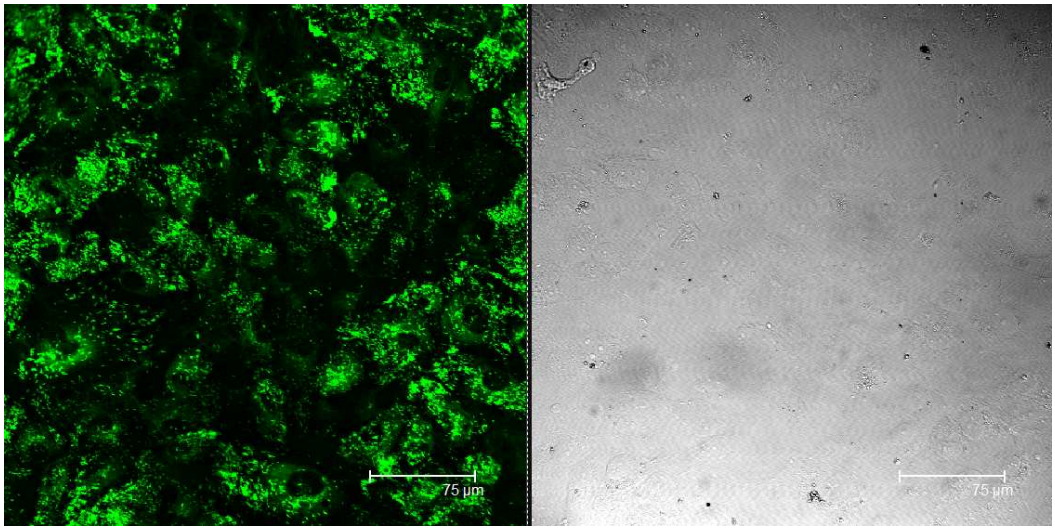


Figure 28 : expression du vWF par des CE au 2ème passage ensemencées sur une lame de verre recouverte de gélatine, mise en évidence par marquage immunofluorescent indirect. À gauche, on voit en vert l'expression du vWF dans le compartiment cytoplasmique de la majorité des cellules (Alexa Fluor® 488) (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). À droite, l'image en lumière transmise montre la monocouche confluente de CE après 48 de culture. (N = 6).

I.2 Réarrangement du cytosquelette d'actine sous contraintes de cisaillement et son impact sur l'activité de la eNOS

Les CE situées à l'interface du sang et de la matrice du vaisseau sanguin sont en permanence exposées à des modifications morphologiques, commençant par l'assemblage des molécules d'actine et la réorientation des éléments constituant le cytosquelette, et allant jusqu'à l'élongation et l'alignement des cellules dans le sens du flux. Les contraintes de cisaillement sont également impliquées dans la fonctionnalisation des CE. Des récepteurs à leur surface perçoivent les contraintes mécaniques et transmettent le signal au noyau en activant plusieurs voies de signalisation. L'une d'entre elles consiste à traduire la stimulation mécanique en signal biochimique impliquant diverses molécules jouant des rôles de seconds messagers. La synthèse de molécules vasoactives est l'une des réponses de la CE aux forces de cisaillement (Noris et al., 1995 ; Fleming et al., 1998 ; Jin et al., 2005). Parmi ces molécules, se trouve NO dont le principal rôle, en ce qui nous concerne, est d'adapter le vaisseau sanguin aux contraintes imposées. Le recrutement du cytosquelette dans le processus de mécanotransduction a fait et fait encore l'objet de beaucoup d'études. Il a été rapporté que la réorganisation du cytosquelette d'actine et la production de NO sont deux mécanismes étroitement liés (Knudsen et al., 1997 ; Su et al., 2003).

Nous avons étudié la réorganisation du cytosquelette et l'activité de la eNOS sur des CE soumises à deux valeurs de la contrainte de cisaillement inspirées de la littérature (1,2 et 2 Pa), chaque contrainte a été appliquée pendant 2 temps (6 et 24h) afin d'étudier son effet à court et à long terme. Cette étude a permis de définir notre modèle de cisaillement afin d'établir un lien éventuel entre le réarrangement du cytosquelette d'actine et l'activité de la eNOS.

Les figure 29 et 30 montrent les résultats obtenus par microscopie confocale du cytosquelette d'actine marqué à la phalloïdine Alexa ® 488 de CE exposées aux contraintes de cisaillement précédemment définies, le sens du cisaillement étant déterminé par la flèche. Les angles d'orientation ainsi que les indices d'élongation ont été mesurés individuellement sur 100 cellules sur chacune des trois expériences différentes, puis représentés sous forme de cytogrammes (cf. Chapitre II ; III.1.2).

On constate que les cellules non soumises au cisaillement (statique), que ce soit à 6h ou à 24h, possèdent une morphologie arrondie avec très peu de fibres de stress. Les cytogrammes montrent une population cellulaire sans orientation ni élongation spécifique, le trait en

pointillé sur la figure 29 à droite sépare les populations allongées ou non ; d'ailleurs, la presque totalité des cellules dans ces conditions possède un indice d'élongation compris entre 0,5 et 1.

À 1,2 Pa de cisaillement pendant 6h (figure 29-b), on observe une orientation et une élongation des cellules dans le sens du flux. L'analyse de l'élongation révèle que 40% des cellules possèdent un indice d'élongation compris entre 0 et 0,5, correspondant à des cellules allongées. Le cytogramme relatif à l'orientation cellulaire révèle, de toute évidence, le même pourcentage de cellules orientées au voisinage de 90° (cercle en pointillé) correspondant aux cellules orientées dans le sens du flux. Ces paramètres (orientation et élongation) sont plus importants à 24h (figure 30-b), où l'élongation cellulaire se traduit par une augmentation du pourcentage des cellules ayant un indice compris entre 0 et 0,5 qui passe de 40% à 54%. De la même manière, le pourcentage de cellules s'orientant au voisinage de 90° augmente, avec 40% de cellules s'orientant entre 90° et 130°, mais aussi cette fois on remarquera environ 17% de cellules orientées entre 70° et 90° et 8% entre 130° et 140°. Ces résultats mettent en évidence l'importance du temps d'exposition dans la réponse cellulaire au cisaillement.

À 2 Pa, le facteur temps joue là aussi un rôle très important : après 6h de contrainte (figure 29-c), la majorité des cellules s'oriente en biais par rapport au sens du flux ; toute la population est décalée sur la partie droite du cytogramme entre 110° et 180° (cercle en pointillé). Concernant l'élongation, le taux obtenu, 54%, est similaire à celui de 1,2 Pa/24h. Après 24h (figure 30-c), le nombre de cellules orientées est augmenté, environ 76% d'entre elles sont orientées au voisinage de 90° (entre 70° et 110°). L'élongation cellulaire révèle que quasiment toutes les cellules possèdent un indice d'élongation compris entre 0 et 0,5, indiquant l'allongement des cellules. Ces résultats mettent en évidence non seulement l'influence du temps d'exposition, mais aussi de l'amplitude de la contrainte, pour preuve le pourcentage d'élongation à 1,2 Pa/24h qui est similaire à celui de 2 Pa/6h. L'augmentation de l'amplitude de cisaillement a permis d'obtenir le même pourcentage d'élongation en moins de temps. Cependant, l'amplitude influence différemment l'orientation des cellules, car celle-ci dépend essentiellement de l'intensité du stress infligé aux cellules qui s'adaptent en s'orientant afin de minimiser cette agression.

En parallèle aux paramètres contrôlant la morphologie cellulaire, nous avons aussi étudié l'activité de la eNOS via la mesure de la production des nitrites présents dans le surnageant après chaque expérience. Pour 1,2 Pa durant 6 et 24h, ainsi que pour 2 Pa durant

6h, on constate une augmentation de 21%, 37% et 36% respectivement dans la production des nitrites par rapport à leurs témoins. Ces résultats mettent en évidence que la production de NO est également proportionnelle à l'amplitude et au temps d'exposition à la contrainte (figure 31). L'augmentation de l'amplitude de cisaillement permet, comme pour l'élongation cellulaire, d'obtenir un même niveau de production de NO en moins de temps : 37% à 1,2 Pa/24h et 36% à 2 Pa/6h. Paradoxalement, à 2 Pa/24h, la quantification des nitrites ne révèle aucune différence entre les cellules cisaillées et non cisaillées (figure 31). La quantification des nitrites entre 6h et 24h en conditions statiques révèle une augmentation de celle-ci, indiquant que la cellule non soumise à un stress maintient une production continue de NO au cours du temps (figure 32).

Contraintes de cisaillement appliquées 6h

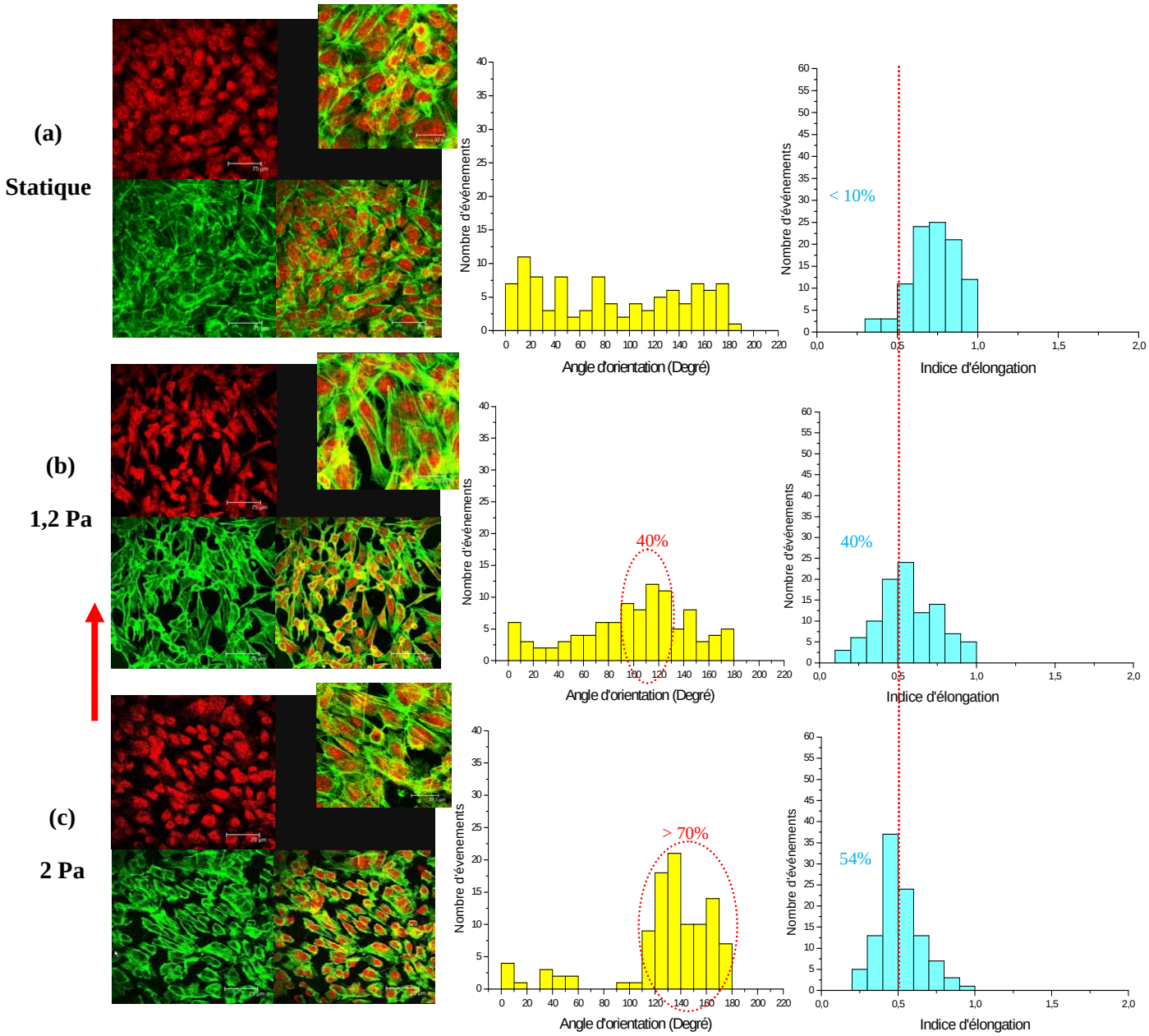


Figure 29 : étude de l'orientation et de l'élongation des CE soumises à des contraintes de cisaillement de 1,2 et 2 Pa pendant 6h. Les paramètres de morphologie cellulaire (orientation et élongation) ont été mesurés grâce au marquage immunofluorescent du cytosquelette d'actine avec la phalloïdine Alexa 488 (en vert). Les mesures ont été effectuées grâce à un logiciel de traitement d'image (ImageJ) et les résultats sont exprimés sous formes de cytogrammes obtenus grâce au logiciel Origin 6.0. En rouge apparaissent les noyaux marqués à l'iodure de propidium. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

Contraintes de cisaillement appliquées 24h

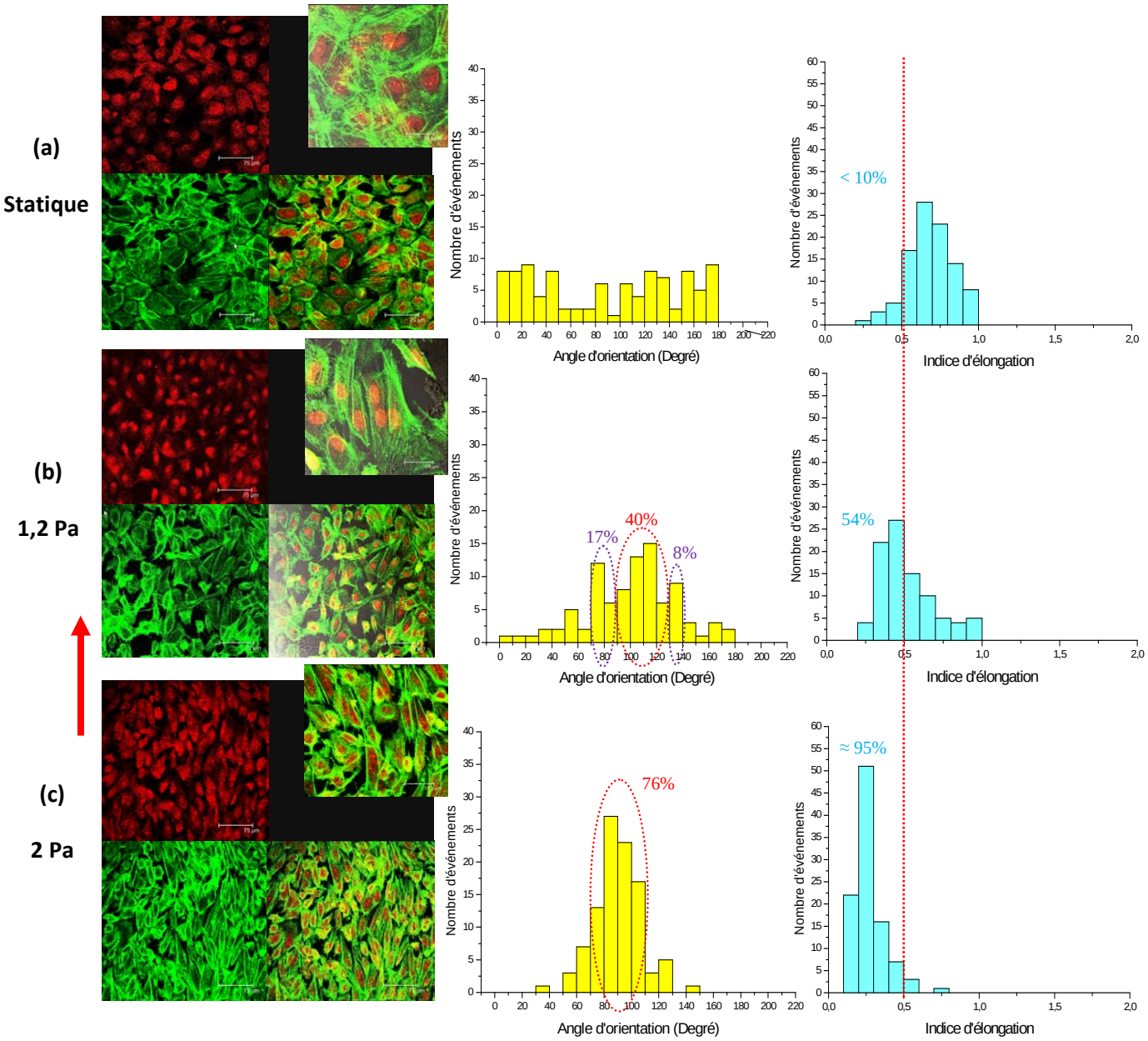
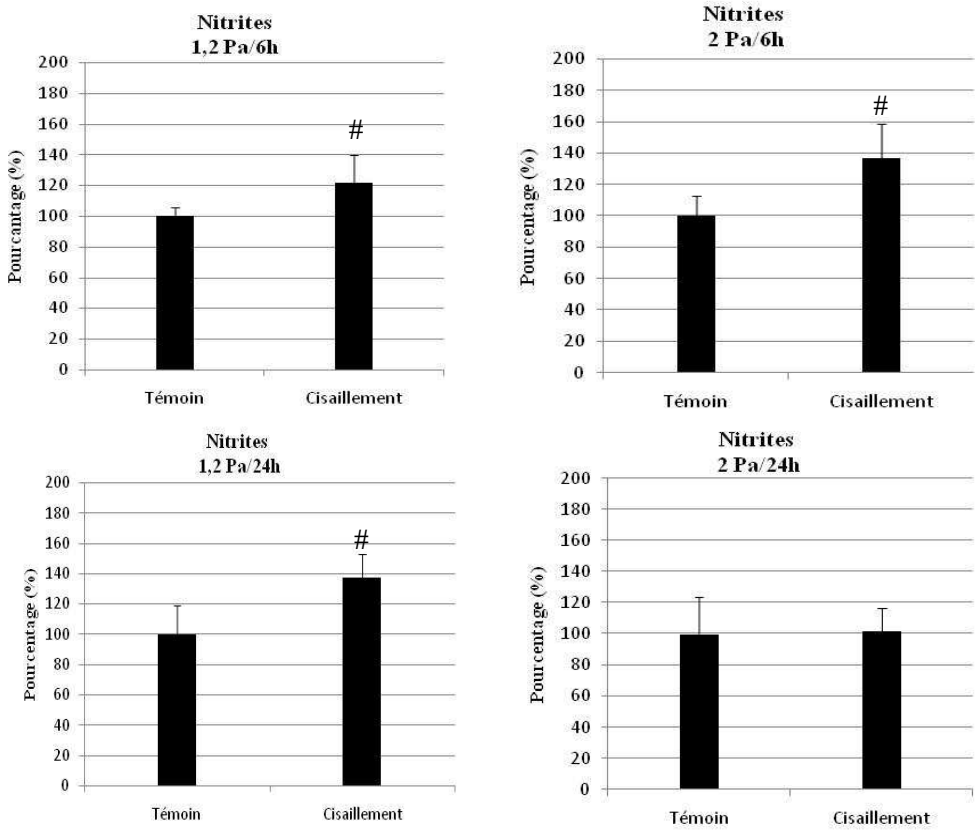
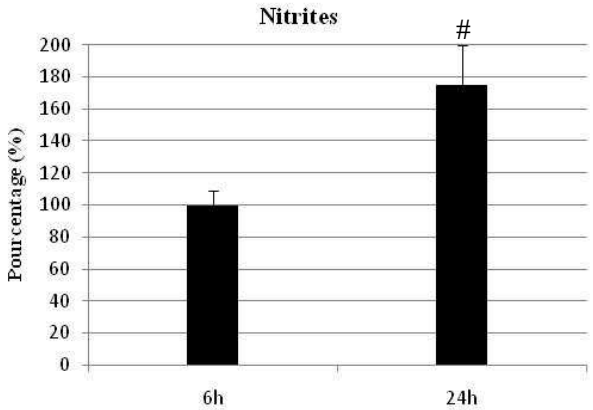


Figure 30 : étude de l'orientation et de l'élongation des CE soumises à des contraintes de cisaillement de 1,2 et 2 Pa pendant 24h. Les paramètres mesurés sont les mêmes que dans la figure 29. Les contraintes de cisaillement entraînent une élongation et une orientation cellulaire dans le sens du flux dépendant de l'amplitude de la contrainte. A 2 Pa/24h, on obtient le maximum d'élongation et un maximum de cellules orientées dans le sens du flux. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).



<u>Figure 31 :</u> production des nitrites par les CE soumises à deux amplitudes de cisaillement (1,2 et 2 Pa) pendant deux périodes (6 et 24h). Les nitrites ont été mesurés dans le milieu de culture grâce au réactif de *Griess* (R&D système, France) puis exprimés en pourcentage par rapport au témoin (= 100%). Les contraintes de cisaillement entraînent l'augmentation de la production des nitrites d'une manière dépendante de l'amplitude et de la durée d'exposition, sauf pour 2 Pa/24h où aucune différence n'est observée par rapport au témoin. (#p<0,01 versus témoin, N = 9).



<u>Figure 32 :</u> production des nitrites par les CE incubées pendant 6 et 24h en conditions statiques. Les nitrites ont été mesurés dans le milieu de culture grâce au réactif de *Griess* (R&D système, France). L'histogramme montre que les cellules continuent à produire les nitrites tout au long de la durée d'incubation en conditions statiques. (#p<0,01 versus 6h, N = 9).

Discussion

Dans cette première partie, nous avons voulu choisir un modèle de culture cellulaire par la vérification du maintien du phénotype endothélial, la définition d'une densité d'ensemencement et le choix d'un modèle de cisaillement. Pour ce faire, les CE ont été soumises à deux amplitudes de cisaillement (1,2 et 2 Pa) que nous avons appliquées chacune pendant une courte (6h) et une longue période (24h). Le but de cette étude était de définir l'influence de l'amplitude et du temps d'exposition aux contraintes de cisaillement sur le réarrangement du cytosquelette d'actine et sur la production de NO (Kadi et al., 2007).

Les meilleurs résultats d'orientation et d'élongation cellulaire dans le sens du flux sont obtenus à 2 Pa/24h. Ces résultats sont entre autres en accord avec ceux de Wedgwood et al., (2001) qui ont soumis des CE d'artère pulmonaire humaine aux mêmes contraintes que les nôtres et ont obtenu un maximum d'élongation et d'orientation. Concernant la production de NO, nos résultats montrent que le cisaillement laminaire continu augmente la production de NO à 6h et que cette production s'accroît en fonction des contraintes ou du temps d'exposition, sauf pour 2 Pa/24h, où les cellules sont orientées et allongées dans le sens du flux. Aucune différence dans la production des nitrites n'est observée par rapport au témoin. En effet il a été rapporté que le cisaillement laminaire augmente la transcription du gène de la eNOS d'une part et la concentration du Ca^{+2} intracellulaire d'autre part, entraînant ainsi l'augmentation de la production de NO (Ayajiki et al., 1996 ; Harisson et al., 2006 ; Lehoux et al., 2006). Noris et al., (1995) ont rapporté qu'une augmentation significative de la production de NO par les CE requiert au moins 6h d'exposition aux contraintes de cisaillement et que cette augmentation est proportionnelle à l'amplitude des contraintes. Ces mêmes auteurs ont été parmi les premiers à suggérer l'éventuelle implication du réarrangement du cytosquelette d'actine dans la production de NO. Ensuite Zharikov et al., (2001) ont constaté, grâce à leur étude sur le rôle du cytosquelette d'actine dans la voie de production de NO, que l'état de polymérisation des filaments d'actine était impliqué dans la régulation du transport de la L-arginine, substrat de la eNOS, sous l'influence d'un transporteur appelé CAT, qui interagit avec l'actine. Ces auteurs ont suggéré que c'est justement par ce biais que la réorganisation du cytosquelette d'actine influence la production de NO. A ce propos, Cicha et al., (2008) ont rapporté que le cisaillement laminaire appliqué pendant 18h entraînait une augmentation de la production de NO accompagnée d'une réduction des fibres de stress. D'un autre côté, Zhu et al., (2003) ont montré que l'augmentation des fibres de stress entraîne la diminution de la production de NO via la translocation de la eNOS dans les fractions cavéolaires situées au

niveau membranaire. En effet, la localisation membranaire de la eNOS abaisse son activité (Jin et al., 1997 ; Su et al., 2003). À partir de ces données bibliographiques, nous avons souhaité quantifier les fibres de stress dans les cellules exposées à 2 Pa de cisaillement pendant 24h, par mesure de l'intensité de fluorescence par unité de pixel. La figure 33 révèle, en effet, une augmentation du nombre de ces fibres par rapport au témoin. A partir de l'ensemble de ces données, nous pouvons proposer une explication aux résultats que nous avons obtenus sur les 4 modèles de cisaillement.

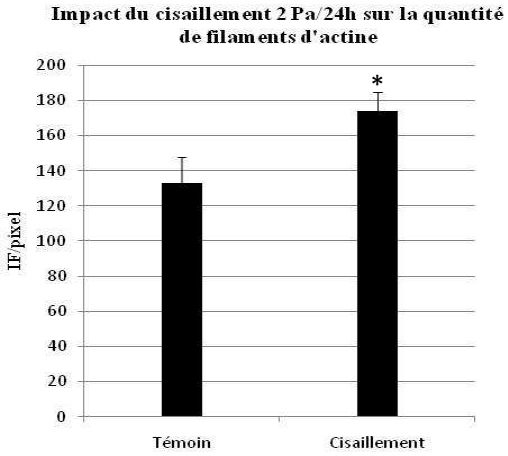


Figure 33 : expression des fibres de stress par les CE soumises ou non aux contraintes de cisaillement de 2 Pa/24h. L'intensité de fluorescence, relative à la quantité des fibres, mesurée sur 100 cellules, augmente quand les cellules sont exposées aux contraintes de cisaillement par rapport au témoin (*P< 0,0001 versus témoin, N = 9).

À l'issue des expériences avec 1,2 Pa pendant 6 et 24h et avec 2Pa pendant 6h, les cellules ne sont pas encore parfaitement orientées dans le sens du flux. Leur cytosquelette est encore en plein mouvement de réorganisation afin de s'orienter pour minimiser le stress dynamique qui leur est imposé. Cette réorganisation se déroule par une série de polymérisations-dépolymérisations des monomères d'actine. Dans ce cas, la eNOS reste probablement en activité car elle serait en permanence péri-nucléaire pendant ce mouvement de réorganisation. Ainsi, pendant la durée du cisaillement, les cellules continuent à produire NO.

En ce qui concerne 2Pa pendant 24h, quasiment 100% des cellules sont allongées et orientées dans le sens du flux, elles augmentent leur expression en fibres de stress et diminuent leur production de nitrites. Nous suggérons que cette diminution est due à l'augmentation de fibres de stress, du fait que Su et al., (2003) ; Zhu et al., (2003) ont rapporté que le nombre de fibres de tress est inversement proportionnel à l'activité de la eNOS.

Après 24h, la même production de nitrites est retrouvée entre les cellules cisaillées et le témoin (figure 31). Nous supposons que ceci revient au fait que les cellules témoin continuent à produire NO tout au long des 24h, en effet, ce résultat est exprimé dans la figure 32, les nitrites s'accumulent alors dans le milieu. En ce qui concerne les cellules cisaillées, nous suggérons qu'il y a production de NO dans les premières heures, mais que cette production serait diminuée au moment où l'expression des fibres de stress augmente. La combinaison de ces deux phénomènes ferait qu'au bout de 24h d'incubation, le même pourcentage de nitrites est retrouvé dans les deux cultures (cellules cisaillées/témoin). Nos résultats se rapprochent de ceux de Wedgwood et al., (2001) qui ont suivi la cinétique de production de NO de 0 à 8h et montré qu'elle se déroulait d'une manière biphasique, caractérisée par une grande libération pendant la première heure de cisaillement puis par un plateau jusqu'à 4h, caractéristique d'une inhibition de la production de NO, et enfin par une augmentation entre 4h et 8h, suggérant que la cellule contrôle sa production en NO par une série d'activations/inhibitions de la voie qui en est responsable. Toutefois, pour confirmer nos suggestions, il serait judicieux de chercher à partir de quel moment l'expression des fibres de stress augmente, sans doute compris entre 6h et 24h, ceci permettrait d'élucider ce phénomène, mais n'était pas l'objet initial de notre étude.

Conclusion 1

À la lumière de ces résultats, nous avons choisi un modèle de culture d'HUVEC en 2ème passage ensemencées à la densité de 10^5 cellules/lame et incubées pendant 48h pour atteindre le stade de confluence. Les cellules seront soumises à un cisaillement de 2Pa pendant 24h pour les raisons suivantes :

1- Ce modèle nous permettra d'évaluer l'effet du Nébivolol sur la production de NO par des cellules qui n'en surproduisent pas normalement dans ces conditions.

2- 2 Pa correspondent à l'amplitude de cisaillement dans les petites artères (rappelons que celles-ci jouent un rôle majeur dans la pression artérielle due au passage du sang dans les vaisseaux sanguins).

I.3 Choix de la concentration du Nébivolol

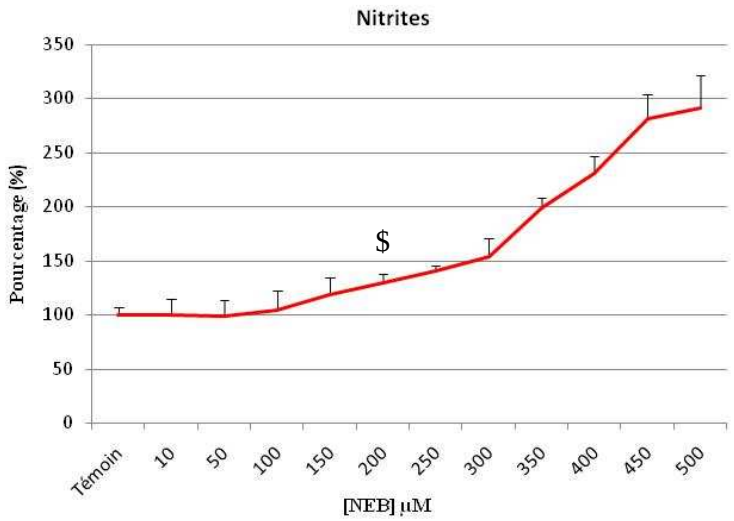
La question de la concentration de Nébivolol avec laquelle nous allons traiter les cellules est majeure, et aucune étude systématique n'est relatée dans la littérature à notre connaissance. Pour ce faire, deux paramètres ont été pris en compte : la production des nitrites et la cytotoxicité du médicament, propriété délétère d'un agent chimique (médicament) ou biologique sur les cellules. Une forte dose de Nébivolol, responsable de l'augmentation de la production de NO, pourrait engendrer une grande production de cette molécule mais endommager directement l'ADN (Brune et al., 1996 ; Kook et al., 2003).

Nous avons évalué la cytotoxicité du Nébivolol par la mesure de la nécrose cellulaire en utilisant l'iodure de propidium. Les cellules nécrotiques permettent l'entrée de ce composé à travers les membranes cytoplasmique et nucléaire et apparaissent donc avec un noyau coloré en rouge en microscopie confocale. En revanche les cellules vivantes n'émettent aucun signal fluorescent.

Nous avons travaillé dans un premier temps avec des concentrations inspirées de la littérature (10, 20, 30,…,100µM) (cf. chapitre I ; Tableau 3), mais ces dernières n'avaient aucun effet sur la production de NO. Nous avons alors testé une large gamme de concentrations plus élevées (150, 200, 250,…,500µM). Ces concentrations ont été ajoutées aux cellules au début de chaque expérience qui a duré 24h. La figure 34 montre qu'il n'y a aucune différence dans la production des nitrites entre 10 et 100µM par rapport au témoin. Cette production n'augmente qu'à partir de 150µM, puis suit une courbe ascendante et proportionnelle aux concentrations de Nébivolol jusqu'à 500µM. Cependant, elle n'est significative qu'à partir de 200µM. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ignarro et al., (2002) qui rapportent que le pourcentage de relaxation d'anneaux d'aortes de rats était proportionnel à la concentration de Nébivolol utilisée.

Le test de toxicité a été effectué pour les concentrations allant de 10 à 300µM seulement. Etant donné que l'augmentation significative de la production de NO commence à 200µM, nous avons estimé inutile d'aller jusqu'aux concentrations les plus élevées. Le test ne révèle aucune nécrose pour les concentrations de 10, 50, 100 et 150µM, les images ne montrant pas de noyaux colorés en rouge. Cependant une quantité faible de cellules nécrotiques, de l'ordre d'1 cellule/10 environ, commence à apparaître à partir de 200µM. Au delà de cette concentration, on observe un taux plus élevé de cellules nécrotiques (figure 35).

Ces observations limitent notre choix à une concentration de 200µM, et ce malgré les 10% de nécrose détectés.



<u>Figure 34 :</u> production des nitrites par des CE incubées pendant une durée de 24h avec des concentrations croissantes de Nébivolol. Dosage réalisé grâce au réactif de *Griess* (R&D système, France) et résultats exprimés en pourcentage par rapport au témoin (=100%). Aucune augmentation de la production des nitrites n'est détectée à 10, 50 et 100µM, une augmentation significative est notée à partir de 200µM. ($p< 0,05 versus témoin, N = 9).

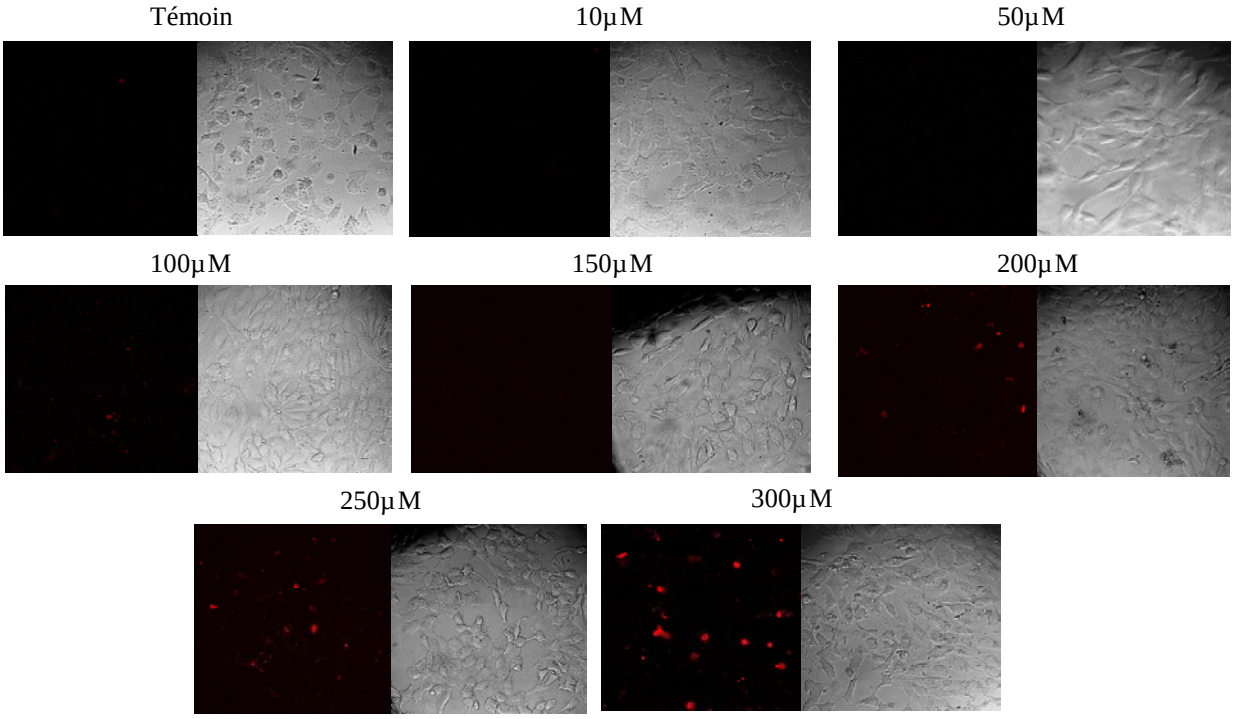


Figure 35 : contrôle de la viabilité de CE après 24h d'incubation avec des concentrations croissantes de Nébivolol. Etude réalisée avec l'iodure de propidium. L'observation par microscopie confocale (à gauche) ne montre aucune nécrose avec le témoin ainsi qu'avec les premières concentrations de Nébivolol jusqu'à 200µM, où un taux très faible de nécrose est observé par des noyaux colorés en rouge. Ce taux augmente à 250 et 300µM (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). Les images obtenues en lumière transmise (à droite) montrent les monocouches de CE sur lesquelles nous avons effectué le test. (N = 6).

Conclusion 2

Grâce à ces mises au point, nous avons retenu une concentration de Nébivolol de 200µM, valeur où l'on observe une augmentation significative de la production des nitrites avec un minimum de nécrose cellulaire.

Mais une libération trop forte de NO peut s'avérer cytotoxique dans certains cas. En effet, NO est un radical libre gazeux soluble qui, produit en trop grande quantité, peut interagir avec l'oxygène pour donner des peroxynitrites $ONOO^-$ qui se décomposent à leur tour et génèrent le radical hydroxyle OH^-. Le peroxynitrite est un composé cytotoxique et oxydant qui peut induire un stress oxydatif. De ce fait, nous avons d'abord voulu vérifier l'impact de la concentration choisie du Nébivolol sur l'induction du stress oxydatif.

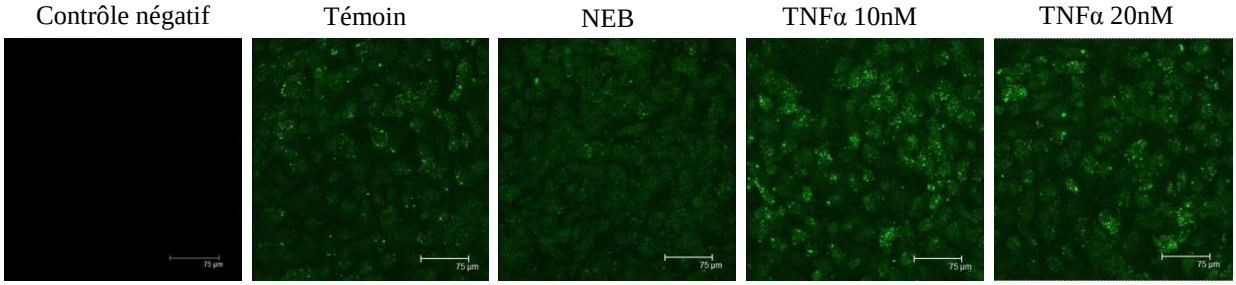
I.4- Impact du Nébivolol sur le stress oxydatif

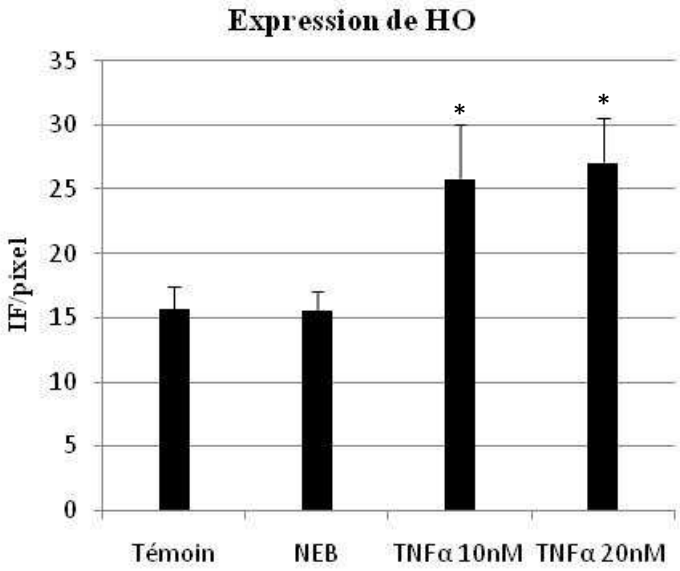
Le stress oxydatif est un type d'agression des constituants de la cellule qui résulte de l'augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées et/ou de la carence en micro-nutriments antioxydants ou en cofacteurs des systèmes enzymatiques antioxydants. Il est fréquent au cours des syndromes inflammatoires (Grisham et al., 1994 ; Jourd'heuil et al., 1997). Pour savoir si le Nébivolol induit ou non un stress oxydatif à la suite de l'augmentation de la production de NO, nous avons étudié, par marquage immunofluorescent, l'expression de la hème oxygénase (HO), qui est induite en cas de stress oxydatif et possède un effet protecteur contre celui-ci. Il existe trois isoformes d'HO :

- ✓ HO-1 : induite en réponse à divers stress : « hypoxie, cytokines inflammatoires,… »,
- ✓ HO-2 : constitutive exprimée dans les conditions normales d'homéostasie,
- ✓ HO-3 : sans activité catalytique propre.

Ainsi, pour détecter un éventuel stress oxydant, nous avons marqué la HO-1 en présence ou non de Nébivolol et nous avons pris pour témoin positif des cellules incubées pendant 24h avec la cytokine inflammatoire TNFα. Le choix des concentrations de TNFα a été basé sur des travaux du laboratoire (thèse : Gaucher., 2007) et sont de 10 et 20nM.

La figure 36 montre que le Nébivolol à la concentration de 200µM n'induit aucune expression de HO-1 par rapport au témoin, contrairement aux cellules incubées avec le TNFα où son expression augmente. Le stress oxydatif est décrit comme étant une cause directe des dysfonctionnements cardiovasculaires provoqués par les radicaux libres oxygénés (Gao et al., 1996). Une étude effectuée par Janssen et al., (2001) a montré que le Nébivolol possède des propriétés anti-oxydantes et qu'il atténue donc indirectement l'expression de HO-1. Nos résultats sont en accord avec ceci puisque aucune différence dans l'expression de HO-1 n'a été observée entre les cellules traitées avec le Nébivolol et le témoin, indiquant que le Nébivolol à la concentration de 200µM n'induit pas de stress oxydatif.





<u>Figure 36 :</u> effet du Nébivolol sur l'éventuelle induction du stress oxydatif. Etude réalisée par marquage immunofluorescent de la HO-1 en utilisant pour témoin positif des CE incubées avec du TNF*α*. La mesure de l'intensité de fluorescence par unité de pixel sur 100 cellules montre que le Nébivolol à 200µM n'entraîne aucune différence d'expression de la HO-1 par rapport au témoin. En revanche, le TNFα l'augmente considérablement par rapport au témoin. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (*p< 0,0001 versus témoin, N = 9).

<u>Conclusion 3</u>

Nous avons donc utilisé pour la suite de notre étude un protocole d'étude des CE qui seront soumises à des contraintes de cisaillement de 2 Pa pendant 24h, en présence de 200µM de Nébivolol.

Partie II

Implication du cytosquelette d'actine dans le mode d'action du Nébivolol

Nous avons montré, à l'instar d'autres auteurs (Kakoki et al., 1999 ; Broeders et al., 2000 ; Parenti et al., 2000 ; Gosgnach et al., 2001 ; Ignarro et al., 2002 ; De Groot et al., 2003 ; Kalinowski et al., 2003 ; Dessy et al., 2005 ; Lekakis et al., 2005 et Evangelista et al., 2007) que le Nébivolol augmente la production de NO. Indépendamment du Nébivolol, la production de NO a été rapportée comme étant intimement liée au réarrangement du cytosquelette d'actine (Zharikov et al., 2001 ; Su et al., 2003). Les mises au point des conditions expérimentales faites, nous allons à présent entamer l'étude de l'implication du cytosquelette d'actine dans la voie d'action du Nébivolol, essentiellement de son rôle dans l'augmentation de la production de NO. Pour ce faire, nous allons commencer par évaluer son effet sur la structure du cytosquelette d'actine, puis établir le lien avec la production de NO.

II.1 Effet potentiel du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine, la production des nitrites et la localisation intracellulaire de la eNOS

Le cytosquelette d'actine est non seulement un moyen par lequel la cellule peut s'adapter et résister à un stress mécanique, mais c'est aussi un système impliqué dans la mécanotransduction. En remodelant sa structure, le cytosquelette d'actine permet à la cellule, via l'activation d'une multitude de voies de signalisation, de répondre aux stimulations extérieures de nature mécanique ou biochimique. La démonstration par de nombreuses équipes, de l'interaction entre la eNOS et l'actine, pourrait constituer une nouvelle voie thérapeutique qui consisterait en la manipulation du cytosquelette afin d'augmenter l'activité de la eNOS et la production de NO (Su et al., 2003).

En accord avec la littérature, nos résultats de la première partie ont montré que le réarrangement du cytosquelette d'actine jouerait un rôle dans la production de NO. Nous avons émis l'hypothèse qu'une molécule telle que le Nébivolol, utilisée dans le traitement de l'HTA et ayant pour principale action d'augmenter la production de NO, pouvait interagir avec le cytosquelette d'actine. Pour nous en assurer, nous avons incubé des CE avec 200µM de Nébivolol pendant une durée de 24h en les soumettant à des contraintes de cisaillement de

2Pa. Le but en premier lieu est d'étudier l'influence potentielle du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine dans des conditions dynamiques ou statiques, puis d'observer l'impact de ceci sur la localisation intracellulaire de la eNOS ainsi que sur la production des nitrites.

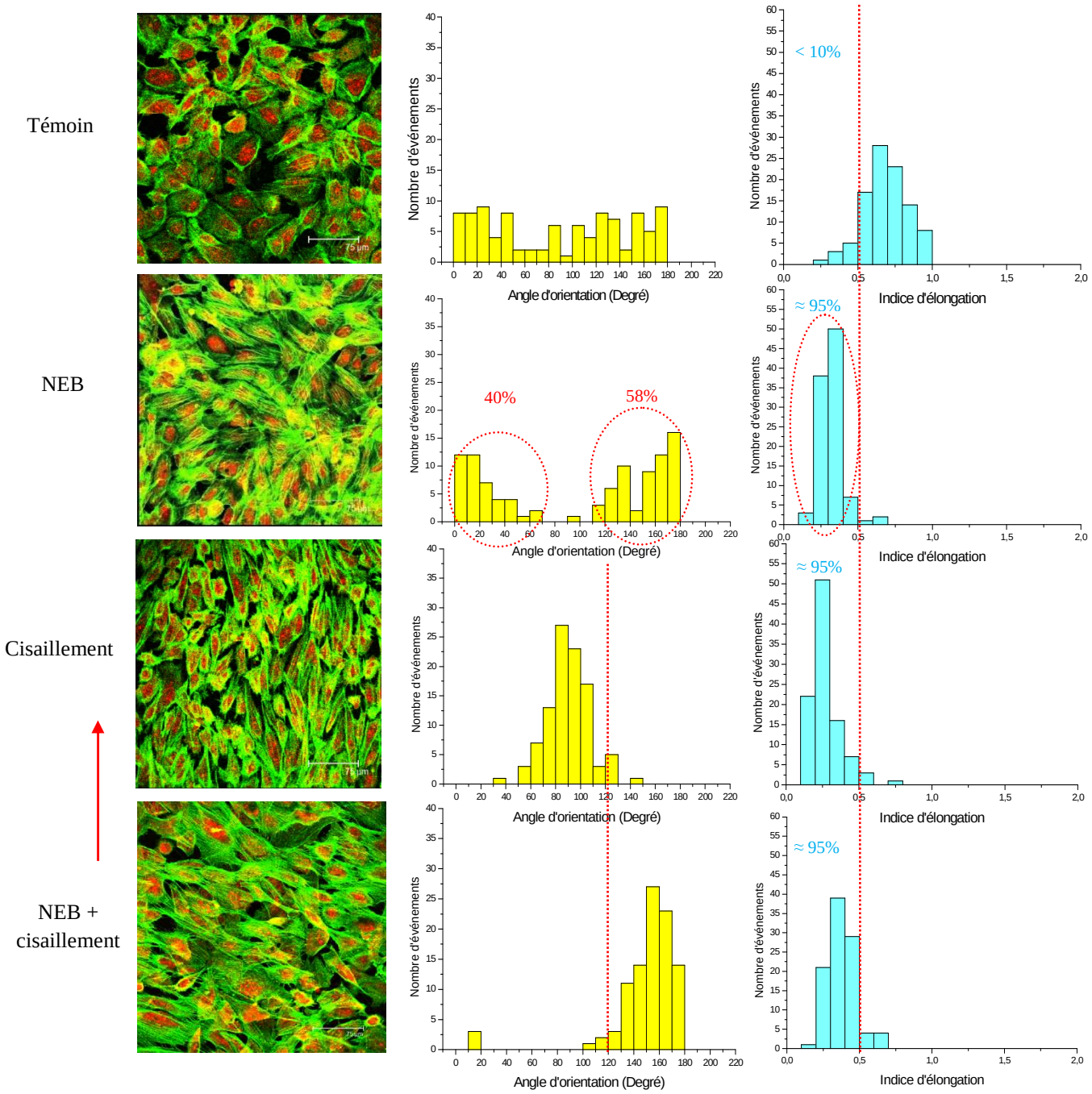
En effet, et tel que le montre la figure 37, le Nébivolol, aussi bien sous contraintes de cisaillement que sans, entraîne des modifications dans la structure du cytosquelette d'actine. Bien que non soumises au cisaillement, quasiment 100% des cellules traitées avec le Nébivolol s'allongent et s'orientent, contrairement aux cellules témoin qui ne présentent aucun caractère d'orientation ni aucune élongation, avec moins de 10% de cellules avec un indice d'élongation compris entre 0 et 0,5. En présence de Nébivolol et sans cisaillement, deux populations cellulaires, l'une correspondant à 40% des cellules et l'autre à 58%, apparaissent sur le cytogramme d'orientation ; on constate que cette orientation est différente de celle observée avec les contraintes de cisaillement car il n'y a pas de rassemblement cellulaire dans une seule zone, les cellules s'orientent mais pas dans une seule direction. Cette orientation est le reflet de l'élongation cellulaire réellement provoquée par le Nébivolol. Les fibres de stress s'organisent en long et de façon parallèle et leur nombre augmente par rapport au témoin ; d'ailleurs, la quantification de l'intensité de fluorescence relative à la quantité de fibres de stress révèle une augmentation par rapport au témoin dans les conditions statiques (figure 38). Parallèlement, la production de nitrites augmente d'environ 30% par rapport au témoin (figure 39). L'étude de la localisation intracellulaire de la eNOS dans ces conditions révèle que l'enzyme est localisée dans la région péri-membranaire dans les cellules témoins mais, qu'après 24h d'incubation avec le Nébivolol sans cisaillement, elle est transloquée dans la région péri-nucléaire (figure 40).

Sous contraintes de cisaillement, le NEB influence fortement l'effet induit par ces contraintes sur l'orientation des cellules. Le cisaillement à 2 Pa pendant 24h entraîne une orientation et une élongation d'une grande majorité des cellules dans le sens du flux et il augmente l'expression des fibres de stress par rapport aux cellules non cisaillées ; en revanche, ces cellules ne produisent plus de NO. La présence de Nébivolol pendant le cisaillement résulte en une orientation différente des cellules par rapport à celles soumises au seul cisaillement (figure 37). On constate aussi un décalage total de la population cellulaire sur la droite du cytogramme en comparaison avec celui des cellules soumises au cisaillement en l'absence de Nébivolol. En revanche, l'élongation cellulaire est toujours aussi importante et concerne quasiment la totalité des cellules. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus

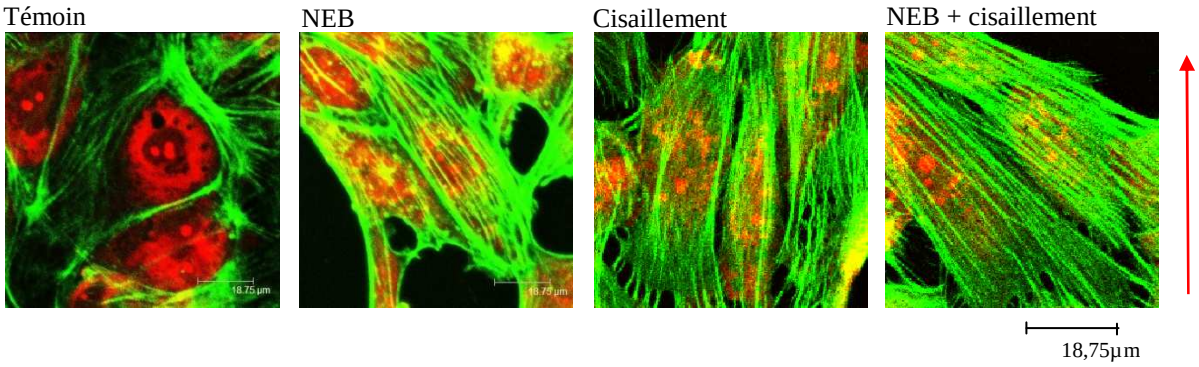
après 6h de cisaillement (première partie, figure 29-c, cellules orientées en biais par rapport au sens du cisaillement) où le temps d'exposition apparaissait insuffisant pour orienter les cellules dans le sens du flux. Ceci pourrait être dû : **1-** Soit à l'augmentation des jonctions d'ancrage dont le nombre dépend de celui des filaments d'actine du cytosquelette, ce qui empêcherait la cellule de s'orienter, même après 24h de cisaillement. **2-** Soit à une modification de la cinétique d'orientation, provoquée par le Nébivolol et qui serait éventuellement due à un effet précoce de celui-ci sur la polymérisation des filaments d'actine et qui serait justement à l'origine de cette modification.

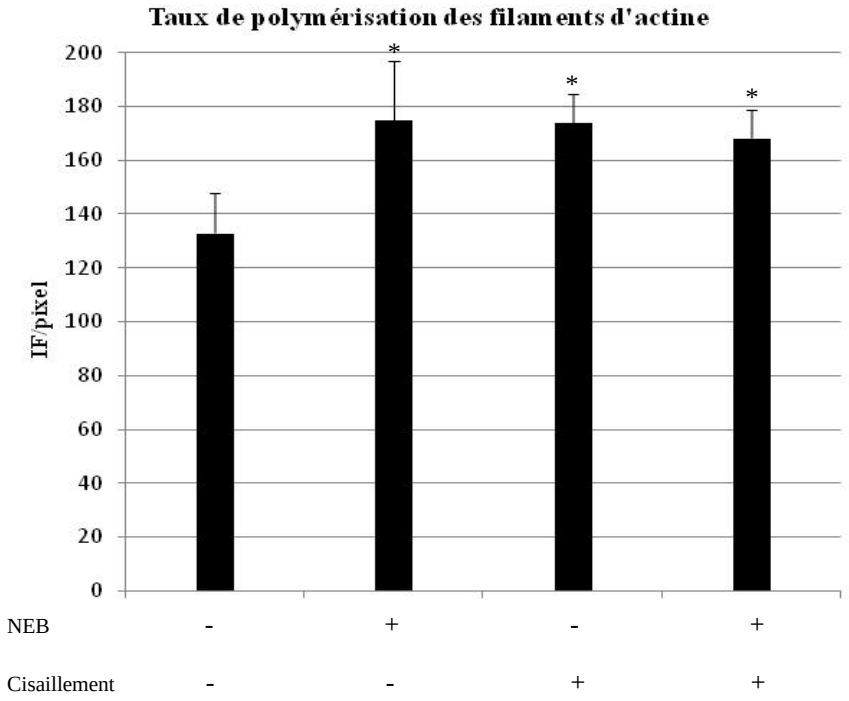
La quantification de l'intensité de fluorescence relative à la quantité des fibres de stress sur 100 cellules, révèle une expression similaire des fibres entre les cellules traitées avec le Nébivolol, celles soumises au cisaillement, ou les deux ensemble (Nébivolol + cisaillement) (figure 38). Cette observation contredit la première hypothèse, car le cisaillement seul, bien qu'il augmente l'expression des fibres de stress, oriente malgré tout les cellules. La quantité des fibres dans ces conditions est plus élevée en comparaison avec le témoin négatif (cellules non soumises au cisaillement et en l'absence de Nébivolol) ; les images de cette figure mettant en évidence le marquage du cytosquelette d'actine et du noyau, montrent bien cette différence d'expression dans les fibres de stress ainsi que dans l'élongation et l'orientation cellulaire.

La présence de Nébivolol dans le milieu des cellules soumises au cisaillement entraîne une augmentation d'environ 60% de la production des nitrites par rapport aux témoins positif (cellules soumises au cisaillement) et négatif (cellules non soumises au cisaillement et en l'absence de Nébivolol) où aucune différence n'est observée au bout de 24h (figure 39), indiquant que cette production des nitrites est bien causée par le Nébivolol et que ce dernier, en modifiant la cinétique d'orientation des cellules, les « incite » à continuer à produire NO. La production des nitrites induite par le Nébivolol est plus importante quand les cellules sont soumises au cisaillement : nous avons noté une différence de 30% entre les deux conditions (Nebivolol + cisaillement / Nébivolol). Parallèlement, l'étude de la localisation intracellulaire de la eNOS révèle que l'enzyme est située dans le compartiment péri-nucléaire des cellules soumises aux contraintes de cisaillement, et ce, en présence ou non de Nébivolol (figure 40).

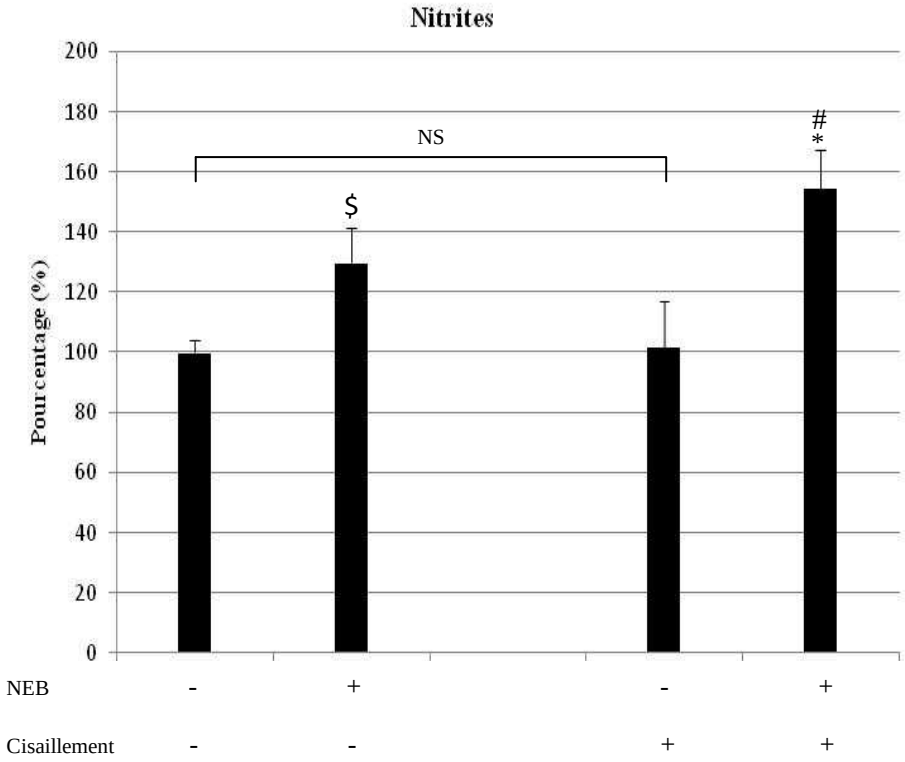


<u>Figure 37 :</u> effet de la présence ou non de Nébivolol sur le remodelage du cytosquelette d'actine de CE soumises ou non aux forces de cisaillement (flèche). Le marquage immunofluorescent avec la phalloïdine Alexa® 488 a permis d'étudier les angles d'orientation ainsi que les indices d'élongation des cellules. Le Nébivolol influence la structure du cytosquelette en entraînant une orientation (cercle en pointillé) et une élongation de la totalité des cellules dans les conditions statiques, et en modifiant la cinétique d'orientation cellulaire dans le sens du flux des cellules cisaillées. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

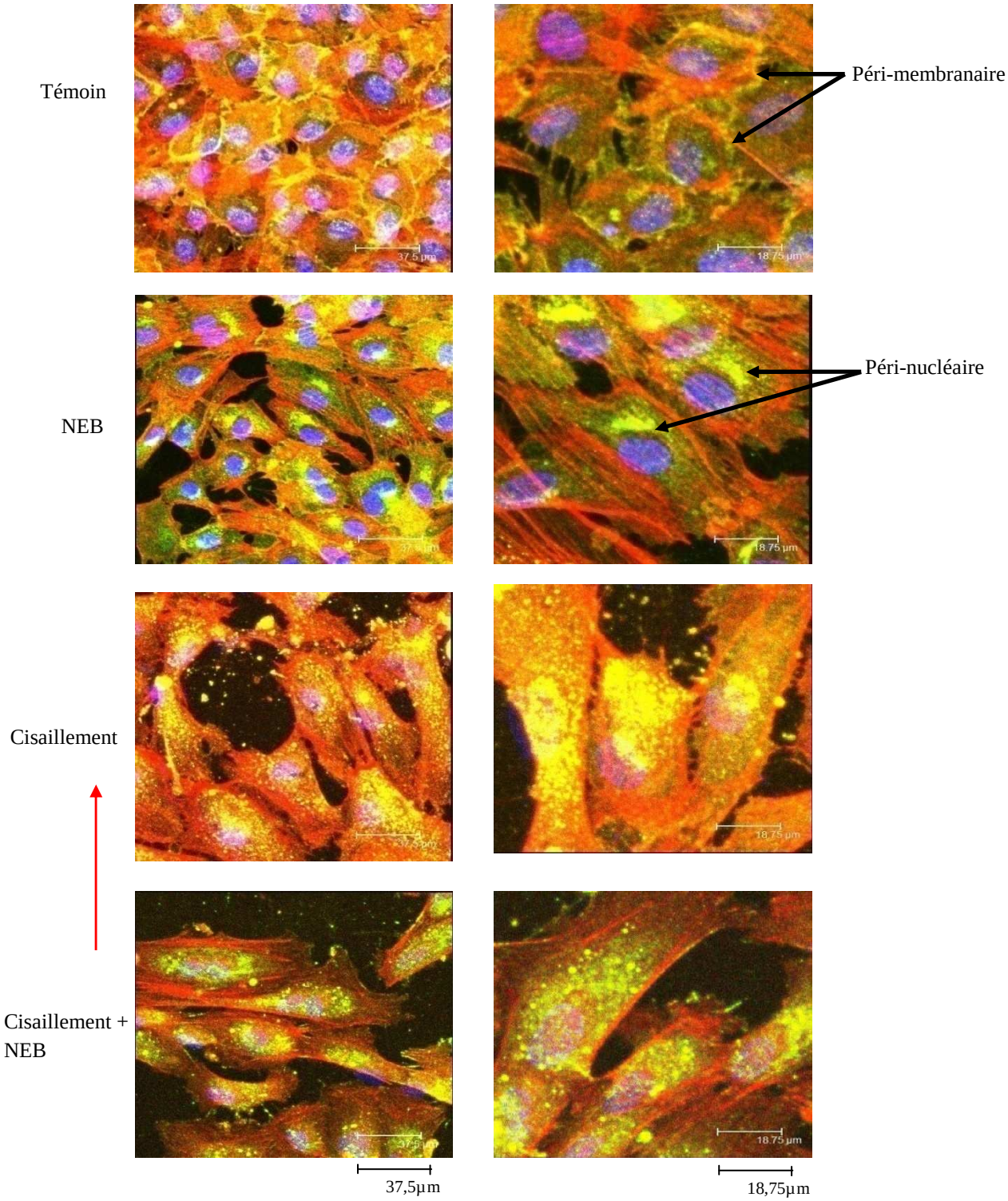




<u>Figure 38 :</u> comparaison de l'expression des fibres de stress dans les CE incubées pendant 24h en présence ou non de Nébivolol et soumises ou non aux contraintes de cisaillement. Les fibres sont marquées à la phalloïdine Alexa® 488 puis quantifiées et les résultats sont présentés en unités arbitraires d'intensité de fluorescence par unité de pixel. Les images montrent que le Nébivolol, les contraintes de cisaillement ou les deux ensemble, augmentent l'expression des fibres de stress par rapport au témoin. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (*p< 0,0001 versus témoin, N = 9).



<u>Figure 39 :</u> production des nitrites par des CE incubées pendant 24h en présence ou non de Nébivolol et soumises ou non à une contrainte de cisaillement après 24h de culture. Dosage réalisé grâce au réactif de *Griess* (R&D système, France). Le Nébivolol augmente la production des nitrites avec ou sans cisaillement avec une production supérieure dans les conditions de cisaillement. ($p< 0,05 versus témoin, *p < 0,0001 versus cisaillement, #p< 0,01 versus NEB sans cisaillement, N = 9).



<u>Figure 40 :</u> expression intracellulaire de la eNOS dans des CE incubées pendant 24h en présence ou non de Nébivolol, et soumises ou non aux forces de cisaillement (flèche verticale à gauche). En vert apparaît la eNOS, en rouge le cytosquelette d'actine marqué à la phalloïdine Alexa ® 594, et en bleu apparaissent les noyaux marqués au Hoechst. Les images montrent que la eNOS est localisée dans la région péri-membranaire (flèches en haut à droite) dans les cellules témoin puis qu'elle transloque dans la région péri-nucléaire (flèches au molieu à droite) quand les cellules sont cisaillées ou incubées avec le Nébivolol sous contraintes de cisaillement ou non (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

Discussion

Dans cette deuxième partie, nous avons approché l'implication du Nébivolol dans le réarrangement du cytosquelette d'actine afin de préciser l'implication de ce dernier dans le mode d'action de cette molécule. L'étude a été menée dans des conditions statiques et sous contraintes de cisaillement, ceci afin d'évaluer ce que pourrait être l'effet du Nébivolol dans les conditions physiologiques. Sur des CE incubées avec le Nébivolol pendant 24h, nous avons analysé les modifications survenues dans la structure du cytosquelette d'actine, et quantifié les nitrites libérés par ces cellules. NO produit par les CE étant principalement généré par la eNOS et dépendant de sa situation dans la cellule, nous avons rapporté ces résultats à la localisation intracellulaire de cette enzyme.

Concernant la production des nitrites, nos résultats sont en accord avec la majorité des données bibliographiques qui certifient que la vasodilatation induite par le Nébivolol est due à l'augmentation de la production de NO par les CE (Parenti et al., 2000 ; Ignarro et al., 2002). Cependant, les recherches sur les mécanismes cellulaires et les voies de signalisation activées par cette molécule proposent différentes hypothèses qui convergent majoritairement vers les récepteurs adrénergiques β3 et la eNOS (Parenti et al., 2000 ; Gosgnach et al., 2001 ; Ignarro et al., 2002 ; Dessy et al., 2005).

Après 24h de culture dans les conditions statiques, le Nébivolol induit visiblement des modifications au niveau de la **structure** et de la **densité** des filaments d'actine du cytosquelette via la formation de fibres de stress responsables de l'orientation et de l'élongation des cellules. Cette molécule induit aussi une translocation péri-nucléaire de la eNOS accompagnée d'une augmentation dans la production des nitrites par rapport aux cultures en l'absence de Nébivolol. Nous pensons que ces deux phénomènes sont sans doute liés. Su et al., (2003 et 2005) ont spécifiquement travaillé sur la régulation de la eNOS par le cytosquelette d'actine. L'utilisation par ces auteurs d'agents stabilisants (phalloïdine) et perturbants (cytochalasine D) du cytosquelette, a permis d'étudier l'impact de sa structure sur la localisation intracellulaire de la eNOS ainsi que sur la production de NO. La perturbation des filaments d'actine entraîne la translocation péri-nucléaire de la eNOS et l'augmentation de la production de NO. Au contraire, la stabilisation de ces filaments empêche la translocation de la eNOS et diminue la production de NO. En conclusion, ces auteurs ont démontré que l'état de polymérisation des filaments d'actine est directement impliqué dans la localisation intracellulaire de la eNOS. Ces résultats sont confirmés par d'autres auteurs qui ont rapporté

que la localisation intracellulaire de la eNOS détermine son activité (Shaule et al., 2002). Su et al., (2003), après avoir prouvé l'interaction entre la eNOS et l'actine par une technique de co-immunoprécipitation, ont effectué un test d'activité sur la eNOS incubée soit avec la F-actine, soit avec la G-actine purifiées. Les résultats ont révélé que l'enzyme est davantage active avec la G-actine (localisée dans la région péri-nucléaire) qu'avec la F-actine, ce qui suggère que la eNOS est active dans la région péri-nucléaire et inhibée dans la région péri-membranaire. Les travaux de Kone et al., (2000) confortent ces résultats en rapportant que l'interaction de la eNOS avec la cavéoline-1 dans les fractions cavéolaires au niveau péri-membranaire, provoque son inhibition. Ceci s'explique par le fait que la cavéoline-1 interagit avec la eNOS via le domaine normalement destiné à la fixation du complexe Ca^{+2}/calmoduline, qui est essentiel à l'activation de l'enzyme.

A notre connaissance, l'effet du Nébivolol sous contraintes de cisaillement *in vitro* n'a encore jamais été étudié. Nous avons déjà constaté que la production des nitrites par les CE soumises au seul cisaillement ne change pas par rapport au témoin. Nous avons alors émis l'hypothèse que cela pouvait être dû à la formation de fibres de stress impliquées dans l'inhibition de la eNOS.

La culture de CE sous contraintes de cisaillement en présence de Nébivolol, conduit à une augmentation dans la production de NO. En même temps, nous avons constaté que le Nébivolol modifie la cinétique d'orientation des cellules dans le sens du flux. Nous avons alors pensé que cette molécule aurait probablement une action précoce sur la polymérisation des filaments d'actine et qui serait à l'origine de ce manque d'orientation. Cependant, après 24h de cisaillement, les cellules, bien que non parallèles au sens du flux, expriment autant de fibres de stress que celles soumises au seul cisaillement, et la eNOS est localisée dans la région péri-nucléaire, que ce soit en présence ou en l'absence de Nébivolol. Tous nos résultats inspirent l'implication de la structure du cytosquelette d'actine dans la régulation de l'activité de la eNOS en réponse au Nébivolol, mais semblent toutefois contredire la littérature sur les points suivants :

1- *La localisation péri-nucléaire de la eNOS après 24h de culture avec le Nébivolol sous contraintes de cisaillement ou non, contradictoire avec l'expression des fibres de stress* : nous avons observé une augmentation de la quantité des fibres de stress correspondant à une stabilisation de la structure du cytosquelette d'actine avec en même temps une localisation péri-nucléaire de la eNOS. Normalement la formation de fibres de stress devrait provoquer la

translocation péri-membranaire de l'enzyme (Zhu et al., 2003 ; Kondrikov et al., 2006). Toutefois, Fleming et al., (2003) ont suggéré que la eNOS localisée dans la région péri-nucléaire pouvait être soit soluble dans le cytosol, soit attachée à des fractions membranaires telles que l'appareil de Golgi ou les filaments d'actine. La eNOS se détache de l'actine corticale par suite d'une dépalmitoylation en réponse à une stimulation mécanique ou biochimique (cf. chapitre I ; V.3) ; elle est ensuite transloquée dans la région péri-nucléaire où elle est considérée comme active. A la suite de sa période d'activité, elle est repalmitoylée et se fixe alors sur la membrane de l'appareil de Golgi où elle se retrouve à nouveau sous forme inactive (Govers et al., 2001). Ces données bibliographiques peuvent nous aider à expliquer nos résultats. Nous suggérons donc que la eNOS, au bout de 24h d'incubation avec le Nébivolol en conditions dynamiques ou non, conserve une localisation péri-nucléaire mais n'est cependant plus active car elle pourrait alors être liée aux fractions membranaire mêlées au cytosol. Afin de nous en assurer, il est essentiel de vérifier l'activité de la eNOS. Rappelons que l'activation de la eNOS dépend de sa phosphorylation par les Akt sur le site Ser^{1177}. L'étude de la phosphorylation de la eNOS sur ce site semble donc être un bon moyen de confirmer l'état de son activité à 24h.

2- *L'augmentation de la production des nitrites par le Nébivolol est contradictoire avec le fait que cette molécule entraîne une augmentation de la formation des fibres de stress* : selon la littérature, la formation des fibres de stress entraîne l'inhibition de la eNOS et donc une diminution de la production de NO (Su et al., 2003).

Pour tenter d'apporter une explication à ces contradictions, nous avons étudié le mécanisme d'action du Nébivolol à des temps plus courts, supposant que cette molécule aurait une action rapide et immédiate sur le cytosquelette d'actine. Pour la suite des travaux, les CE seront maintenues dans les conditions statiques uniquement (non soumises au cisaillement). Dans un premier temps, nous envisagerons d'étudier l'impact du Nébivolol sur la structure du cytosquelette d'actine ainsi que la production des nitrites au cours du temps. Ensuite, nous prévoyons l'étude de la phosphorylation de la eNOS au cours de ces mêmes périodes.

II.2 Effet du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine et la production des nitrites au cours du temps

L'effet du Nébivolol sur le réarrangement du cytosquelette d'actine ainsi que sur la production des nitrites à court terme a été réalisé à 30min, 1h, 3h, 5h, 15h et 24h dans le but de mettre en évidence une éventuelle action précoce de cette molécule sur la structure du cytosquelette, ce qui pourrait alors expliquer les résultats contradictoires observés à 24h. Le cytosquelette d'actine a été marqué et observé en 3D par microscopie confocale. L'intensité de fluorescence est mesurée sur 100 cellules individuellement et les résultats sont exprimés sous forme de graphiques représentant l'intensité de fluorescence par unité de pixel en fonction du nombre d'événements. Nous avons choisi cette méthode car nous avons estimé important d'évaluer le pourcentage des cellules qui réagissent de la même manière au traitement avec du Nébivolol.

La figure 41 rassemble les images 3D du marquage du cytosquelette d'actine aux différents temps d'incubation avec ou sans Nébivolol en l'absence de contraintes de cisaillement ; à chaque condition correspond un graphique de distribution qui présente deux populations cellulaires : témoin et CE en présence de Nébivolol.

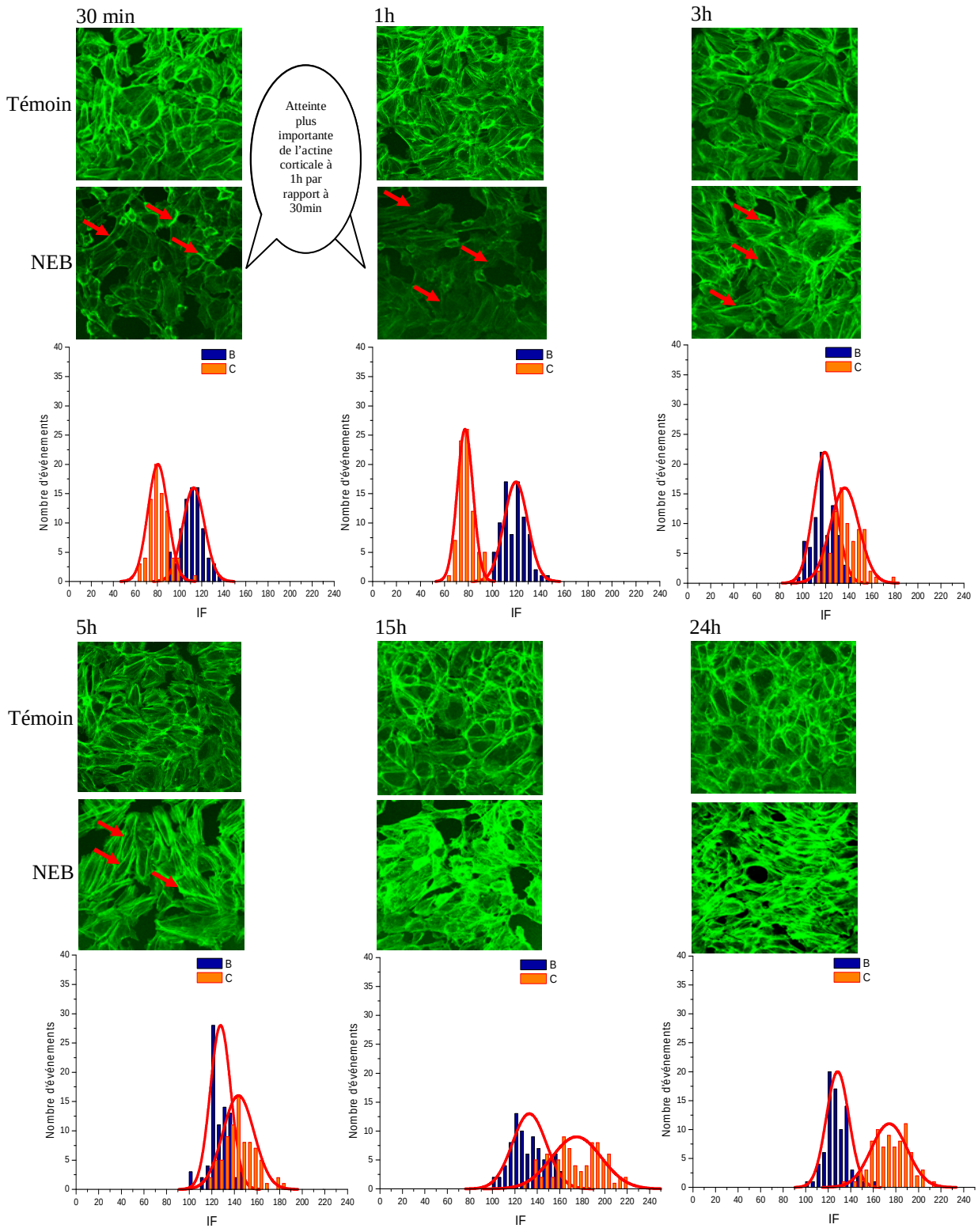
A **30min** et **1h** d'incubation en présence de Nébivolol, les images du cytosquelette d'actine des CE révèlent une dépolymérisation très importante des filaments avec une atteinte de l'actine corticale (flèches), surtout après 1h d'incubation. Rappelons que l'actine corticale est le siège de la localisation péri-membranaire de la eNOS. Les histogrammes correspondant à ces images présentent deux populations cellulaires bien distinctes, et, en présence de Nébivolol, quasiment 100% de la population cellulaire se décale sur la gauche de l'histogramme, traduisant une diminution très importante dans l'intensité de fluorescence marqueur de la quantité des filaments d'actine. Ceci traduit une plus faible quantité d'actine dans les cellules traitées avec le Nébivolol par rapport au témoin.

A **3h** et **5h**, les images révèlent une repolymérisation des filaments d'actine avec une reconstitution de l'actine corticale (flèches) ; les histogrammes montrent que les deux populations cellulaires s'intercalent avec environ 50% des cellules traitées présentant une fluorescence supérieure aux cellules non traitées. Ces résultats indiquent qu'en présence de Nébivolol, la moitié des cellules expriment plus de filaments d'actine que les cellules cultivées en l'absence de Nébivolol aux temps définis ci-dessus.

Après **15h** d'incubation, le pourcentage de cellules exprimant les fibres de stress est encore supérieur à celui du témoin pour atteindre à peu près la totalité à **24h**. Les images du cytosquelette d'actine montrent cette différence dans l'intensité de fluorescence entre les deux cultures.

Nous remarquons que la population cellulaire cultivée en l'absence de Nébivolol présente un léger décalage vers la droite de l'histogramme au cours du temps, traduisant une augmentation dans la quantité des filaments. Ceci est probablement dû à la croissance cellulaire car il est connu que les cellules expriment plus de filament d'actine quand elles sont à confluence. Ainsi à 30min, la population cellulaire (témoin) est comprise entre 60 et 100 en unité arbitraire d'intensité moyenne de fluorescence et, à 24h, elle est décalée entre 100 et 160.

La figure 42-A exprime l'intensité de fluorescence par unité de pixel des filaments d'actine des CE traitées ou non avec le Nébivolol au cours du temps. Nous avons choisi la forme de graphiques facilitant la comparaison avec la production des nitrites (figure 42-B) dans ces mêmes conditions. Le graphique (A) montre que le Nébivolol entraîne une diminution de la polymérisation des filaments d'actine pendant la première heure d'incubation, et qu'ensuite cette quantité augmente à 3h pour se confondre avec le témoin. Au delà, la quantité de filaments d'actine augmente par rapport à celle du témoin. Parallèlement, les résultats de la production des nitrites (graphique B) révèlent une augmentation très importante dans la première heure d'incubation avec le Nébivolol par rapport au témoin, puis une diminution progressive entre 1h et 3h. Au-delà, le pourcentage des nitrites reste stable jusqu'à 24h, quoique toujours significativement supérieur au témoin. Ces résultats permettent de mettre en évidence une relation inversement proportionnelle entre la polymérisation des filaments d'actine et la production de NO.



<u>Figure 41 :</u> effet du Nébivolol sur la structure du cytosquelette d'actine au cours du temps sur des cellules non soumises au cisaillement. Quantification des fibres de stress marquées à la phalloïdine Alexa® 488 avec un logiciel de traitement d'image. La quantification a été réalisée sur 100 cellules pour chaque temps.
Le Nébivolol entraîne la dépolymérisation des filaments d'actine dans la première heure d'incubation suivie d'une augmentation des fibres de stress par rapport au témoin à partir de 3h, (Témoin, + Nébivolol), (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

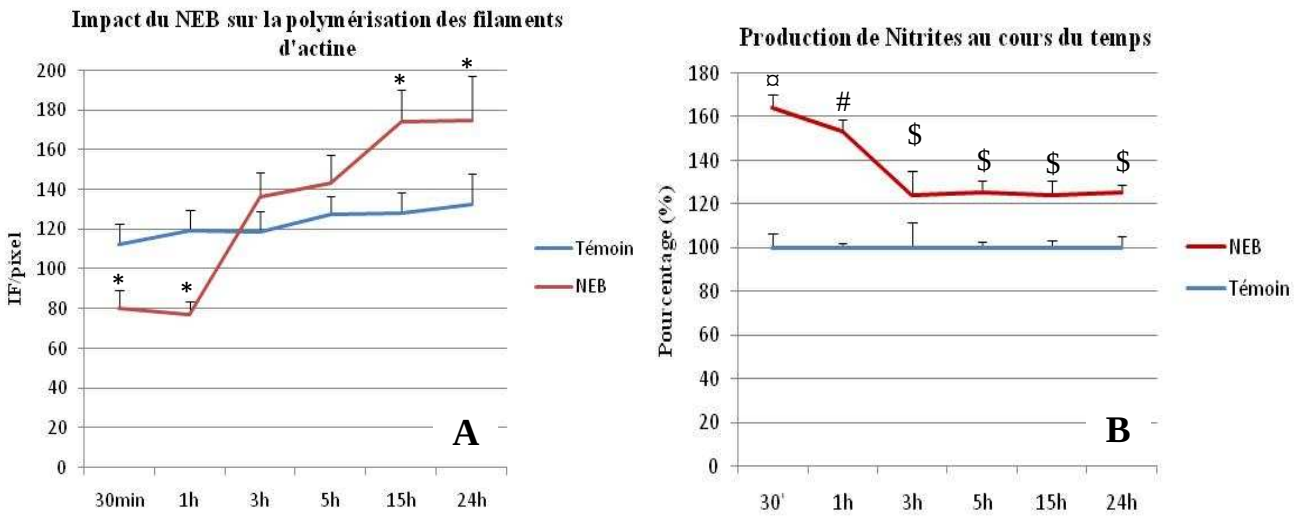


Figure 42: rapport entre l'état de polymérisation des filaments d'actine et la production des nitrites dans les CE incubées avec le Nébivolol pendant différents temps. A : diminution du nombre de filaments d'actine pendant la première heure d'incubation suivie d'une augmentation pour attendre un niveau significativement élevé par rapport au témoin à 15 et 24h . **B :** augmentation de la production des nitrites pendant la première heure, suivie d'une diminution pour se stabiliser à partir de 3h. (*p< 0,0001versus témoin, ¤p< 0,001 versus témoin, #p< 0,01 versus témoin, $p< 0,05 versus témoin, N = 6).

Discussion

Le point important de ces résultats résulte d'une « coïncidence » entre la repolymérisation des filaments d'actine à partir de 3h d'incubation avec le Nébivolol et la diminution du taux de nitrites. Nos résultats sont en accord avec la littérature : Su et al., (2003) et Kondrikov et al., (2006) ont rapporté que l'augmentation de la quantité de filaments d'actine entraîne la diminution de la production de NO. Le complexe eNOS/cavéoline-1 formé au niveau de la membrane plasmique, est affecté par l'état de polymérisation du cytosquelette d'actine (Schilling et al., 2006). Ainsi nous pouvons apporter une explication à la première contradiction évoquée dans la partie précédente « concernant l'augmentation de la production des nitrites au même temps que la quantité des filaments d'actine après 24h d'incubation ». Comme nous l'avions envisagé, le Nébivolol semble posséder un effet précoce sur le cytosquelette d'actine ; aussi, nous suggérons que cette molécule, en dépolymérisant les filaments d'actine, surtout l'actine corticale, durant la première heure d'incubation, provoque la rupture du complexe eNOS/cavéoline-1, responsable de la

libération et de la translocation de l'eNOS qui augmenteront la production de NO. À partir de 1h, la diminution du taux de nitrites pourrait être due à un feed-back négatif auquel participerait NO pour inhiber sa propre production. Ceci impliquerait également le cytosquelette d'actine comme le prouve entre 1h et 3h la reconstitution de l'actine corticale et des filaments d'actine. Ainsi, nous suggérons que les 30% de différence dans la production des nitrites observés au bout de 24h par rapport témoin correspondraient en fait aux traces des nitrites produits pendant la première heure d'incubation. Le pourcentage diminue car il est calculé à chaque temps par rapport à son propre témoin. Le différentiel entre les CE témoins et traitées se réduit progressivement en fonction du temps car le témoin maintient une production basale de NO. Selon Li et al., (2002), cette régulation négative de la production de NO est capitale pour maintenir la viabilité cellulaire car une trop forte expression de NO provoque une nécrose cellulaire.

Une étude récente (Parinandi et al., 2007) a rapporté que NO est directement impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine en augmentant l'expression des fibres de stress. Afin de nous assurer que les changements observés dans la structure du cytosquelette sont bien dus au Nébivolol et non au NO, il était nécessaire de vérifier l'effet d'un donneur direct de NO sur le réarrangement du cytosquelette d'actine pendant les mêmes périodes, et de comparer les profils de réorganisation du cytosquelette avant de procéder à l'étude de la phosphorylation de la eNOS en réponse au Nébivolol.

Contrôle 1

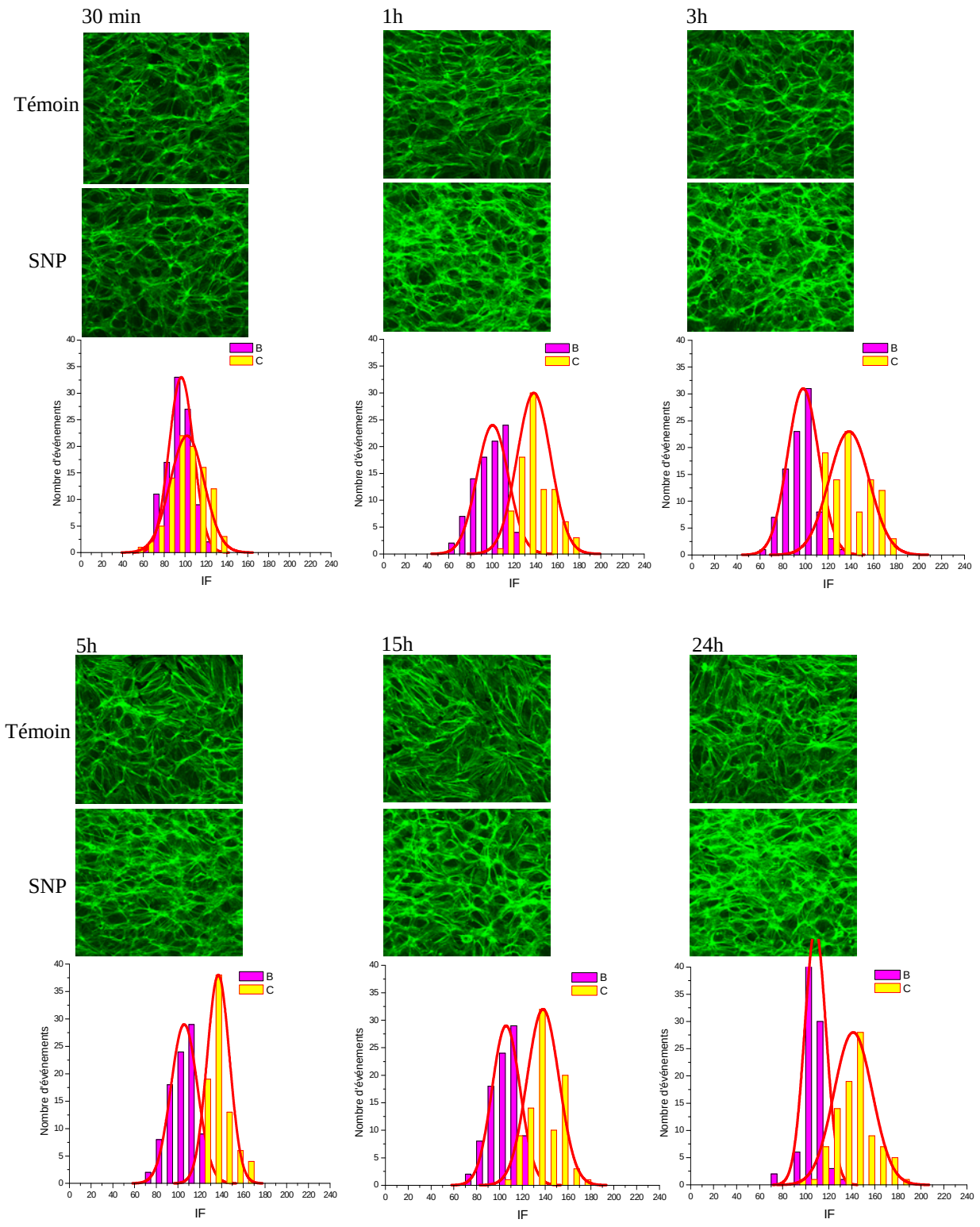
Influence d'un donneur direct de NO : le Nitroprussiate de sodium (SNP), sur la polymérisation des filaments d'actine et la production de NO au cours du temps

La production de NO est régulée par un mécanisme impliquant plusieurs éléments, qui commence par la stimulation mécanique et/ou biochimique de la cellule, et se poursuit par l'activation de voies de signalisation impliquant plusieurs protéines et kinases pour aboutir à l'activation de la eNOS. Le cytosquelette d'actine s'avère donc être un des premiers éléments impliqués dans cette régulation, et ce en modifiant son architecture afin de libérer la eNOS. Nous avons effectivement constaté que l'incubation des CE avec le Nébivolol apporte des changements notables au niveau de la structure du cytosquelette d'actine. Ces changements varient au cours du temps avec une dépolymérisation des filaments au cours de la première heure d'incubation, suivie d'une augmentation dans la formation des fibres de stress à partir de 3h pour accroître de plus en plus leur nombre jusqu'à 24h.

Afin de nous assurer que les changements dans la structure du cytosquelette d'actine sont dus au Nébivolol et non au NO, nous avons vérifié l'état de polymérisation de ces filaments au cours du temps avec un donneur direct de NO. Les CE ont été incubées avec 150µM de SNP (concentration inspirée de la littérature) (Parinandi et al., 2007 ; Selemidis et al., 2007), pendant 30min, 1h, 3h, 5h, 15h et 24h. À la fin de chaque temps d'incubation, le cytosquelette d'actine a été marqué puis observé par microscopie confocale et les résultats exprimés comme précédemment.

A **30min** d'incubation, les images ne révèlent aucune différence entre les cellules traitées avec le SNP et les cellules témoins (figure 43) ; d'ailleurs l'histogramme présente une superposition des deux populations cellulaires.

Dès **1h** d'incubation, on observe un décalage de la population cellulaire traitée avec le SNP de telle sorte que plus de 50% des cellules augmentent leur taux d'expression en fibres de stress par rapport au témoin. Cette expression reste stable et supérieure au témoin jusqu'à 24h, tandis qu'avec le Nébivolol, les cellules après 1h de culture, expriment très peu de fibres de stress. Ces dernières augmentent à 3h, et nous observons enfin le même effet pour le Nébivolol et le SNP après 24h de culture, où la quasi-totalité des cellules expriment plus de fibres de stress que le témoin.



<u>Figure 43 :</u> impact d'un donneur direct de NO (SNP) sur l'expression des fibres de stress au cours du temps. Ces fibres ont été marquées avec la phalloïdine Alexa® 488 et quantifiées sur 100 cellules pour chaque temps. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires d'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'événements. Le SNP entraîne une augmentation d'expression des fibres de stress à partir d'1h d'incubation pour la majorité des cellules et persiste jusqu'à 24h (Témoin, SNP). (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

Afin de nous assurer de l'efficacité du SNP à générer NO, nous avons quantifié les nitrites dans le milieu de culture. La figure 44-A montre que tout comme le Nébivolol, le SNP augmente le pourcentage des nitrites dès 30 min de culture par rapport au témoin. Cette quantité diminue progressivement au cours du temps, probablement pour la même raison que celle citée précédemment. La baisse du différentiel entre SNP et témoin au cours du temps revient au fait que la production des nitrites à chaque temps est calculée en fonction de son propre témoin. Ces résultats semblent indiquer qu'aucune production de NO n'a été effectuée par les cellules et que les seuls nitrites présents dans le surnageant proviennent du SNP. Ceci suggère donc que le donneur de NO a un effet inhibiteur sur la eNOS. Ce même résultat a été rapporté dans la littérature (Ma et al., 1996 ; Fleming et al., 1999 ; Abu Soud et al., 2000).

Les graphiques B et C de la figure 44 montrent la comparaison des profils de réarrangement du cytosquelette d'actine entre les cellules traitées avec le Nébivolol et celles traitées avec le SNP. Ces graphiques expriment chacun l'intensité de fluorescence par unité de pixel correspondant à la quantité de filaments d'actine en fonction du temps. Nous observons de manière très claire une différence entre les deux profils pendant la première heure d'incubation (cercles en pointillés) : le Nébivolol (C) entraîne d'abord une diminution de la quantité des filaments (dépolymérisation) alors que le SNP (B) l'augmente d'emblée (polymérisation).

Au-delà de 1h, le Nébivolol augmente la polymérisation. Quant au SNP, il entraîne une stabilisation dans la quantité des filaments après 1h. Ce résultat est en accord avec celui de Parinandi et al., (2007). En incubant des CE avec un donneur direct de NO (SNP) pendant 2h, ces auteurs ont constaté que cette molécule contribuait à la modification de la structure du cytosquelette d'actine en augmentant la formation de fibres de stress.

Pour les cellules incubées avec le SNP (figure 44-B), nous distinguons 2 phases dans la réorganisation du cytosquelette d'actine :

Phase I : entre 30 min et 1h, correspondant à une augmentation dans la formation des filaments d'actine,

Phase II : entre 1h et 24h, correspondant à un plateau caractéristique d'un niveau maximal de polymérisation de l'actine.

En ce qui concerne les cultures en présence de Nébivolol (figure 44-C), 3 phases sont distinguées :

Phase I : entre 30 min et 1h, correspondant à une dépolymérisation des filaments d'actine,

Phase II : entre 1h et 15h, correspondant à une augmentation continue dans la polymérisation des filaments. Dans cette phase, nous distinguons même 3 profils différents (flèches rouges) : une polymérisation très importante et rapide entre 1h et 3h coïncidant avec une diminution brutale de la production des nitrites, puis une polymérisation lente entre 3h et 5h suivie d'une autre polymérisation importante entre 5h et 15h. Nous ne savons pas pourquoi les cellules se comportent de la sorte. Toutefois, nous pouvons imaginer que la période comprise entre 3h et 5h pourrait correspondre à une étape de transition dans laquelle la polymérisation de l'actine est ralentie suite à une carence en éléments nécessaires à son déroulement, surtout que cette période est précédée par une polymérisation brutale et très importante de l'actine. Ainsi le phénomène serait ralenti afin de donner le temps à la cellule de produire les éléments manquants.

Phase III : caractérise la période comprise entre 15h et 24h et correspond à un plateau indiquant encore une fois le niveau maximal de polymérisation.

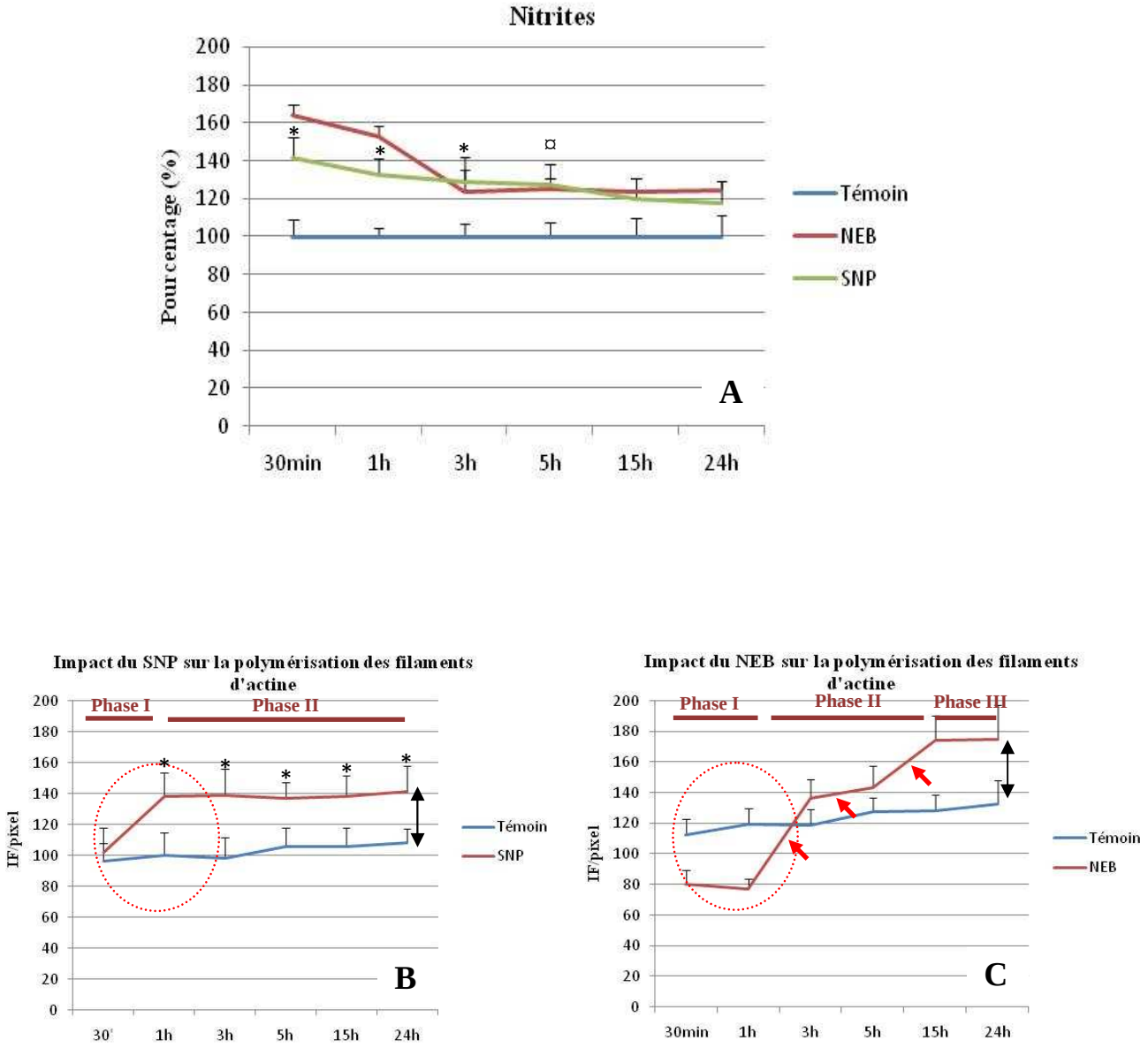
Nous pouvons constater que la différence entre la polymérisation maximale des filaments d'actine dans les cellules traitées avec le SNP ou le Nébivolol et les cellules non traitées est quasiment identique avec une différence d'environ 20 unités arbitraires d'intensité de fluorescence dans les deux conditions (flèches à double pointe). Ceci confirme que la quantité de NO produite par 200µM de Nébivolol est suffisante pour induire un puissant feed-back négatif pour atteindre le niveau maximal de polymérisation d'actine.

Ainsi, nous sommes en accord avec la littérature sur le fait que NO possède une influence sur la structure des filaments d'actine et contribue par là à l'inhibition de sa propre synthèse (Zharikov et al., 2000 ; Parinandi et al., 2007 ; Kondrikov et al., 2006).

Le SNP et le Nébivolol, bien qu'ils augmentent tous les deux la production des nitrites au cours de la première heure d'incubation, ont un effet opposé sur la structure des filaments d'actine. Nous pouvons expliquer cela par le fait que le SNP, de par sa qualité de donneur direct de NO, entraîne une polymérisation immédiate des filaments d'actine. Or, le Nébivolol augmente la production de NO via l'activation d'une voie de signalisation, laisant croire qu'il maintient la dépolymérisation des filaments au cours de la première heure d'incubation (pour libérer la eNOS et produire NO). A partir de ceci, nous pouvons proposer l'hypothèse que la repolymérisation des filaments d'actine à partir de 3h dans les cellules traitées avec le

Nébivolol serait provoquée par NO produit pendant la première heure et que cette repolymérisation aurait pour principal but de diminuer la production de NO dans les heures qui suivent. Ceci est justement le feed-back négatif induit par NO et évoqué plusieurs fois dans la littérature (Shen et al., 1999 ; Li et al., 2002).

Ce résultat apporte un argument supplémentaire pour expliquer la contradiction des résultats évoquée dans la première partie, et renforce notre hypothèse qu'après 24h d'incubation avec le Nébivolol, la eNOS, bien que localisée dans le compartiment péri-nucléaire, doit probablement être inactive. Cette étude fera justement l'objet de la partie suivante de ce travail.



<u>Figure 44 :</u> comparaison des profils d'expression des fibres de stress par les CE en présence ou non de Nébivolol ou de SNP. Tout comme le Nébivolol, le SNP entraîne une augmentation de la quantité des nitrites dans le milieu dès 30 min de culture **(A)**, il entraîne aussi une augmentation de l'expression des fibres de stress dans la première heure d'incubation **(B)**. En revanche avec le Nébivolol, on observe une diminution de l'expression des filaments d'actine pendant la première heure d'incubation suivie d'une repolymérisation. Cette dernière se déroule suivant trois étapes (flèches) : une repolymérisation rapide entre 1h et 3h suivie d'un plateau entre 3h et 5h, puis une autre polymérisation pour atteindre un niveau maximal à 15h **(C)**. (*p< 0,0001 versus témoin, ¤p< 0,001 versus témoin, N = 9).

Conclusion 4

A la lumière de ces observations, nous avons tenté sur la figure 45 de schématiser les différents événements que nous avons pu mettre en évidence. Nous avons observé que l'action du Nébivolol sur les CE implique la réorganisation du cytosquelette d'actine, en provoquant une dépolymérisation des filaments pendant la première heure d'incubation. Cette dépolymérisation a pour résultat la libération de la eNOS dans le compartiment péri-nucléaire et donc son activation, d'où l'importante production de NO observée dans la première heure d'incubation. En conséquence, les monomères d'actine se repolymérisent en filaments, probablement pour inhiber la eNOS en formant des complexes eNOS/F-actine préalablement décrit dans la littérature (Su et al., 2003).

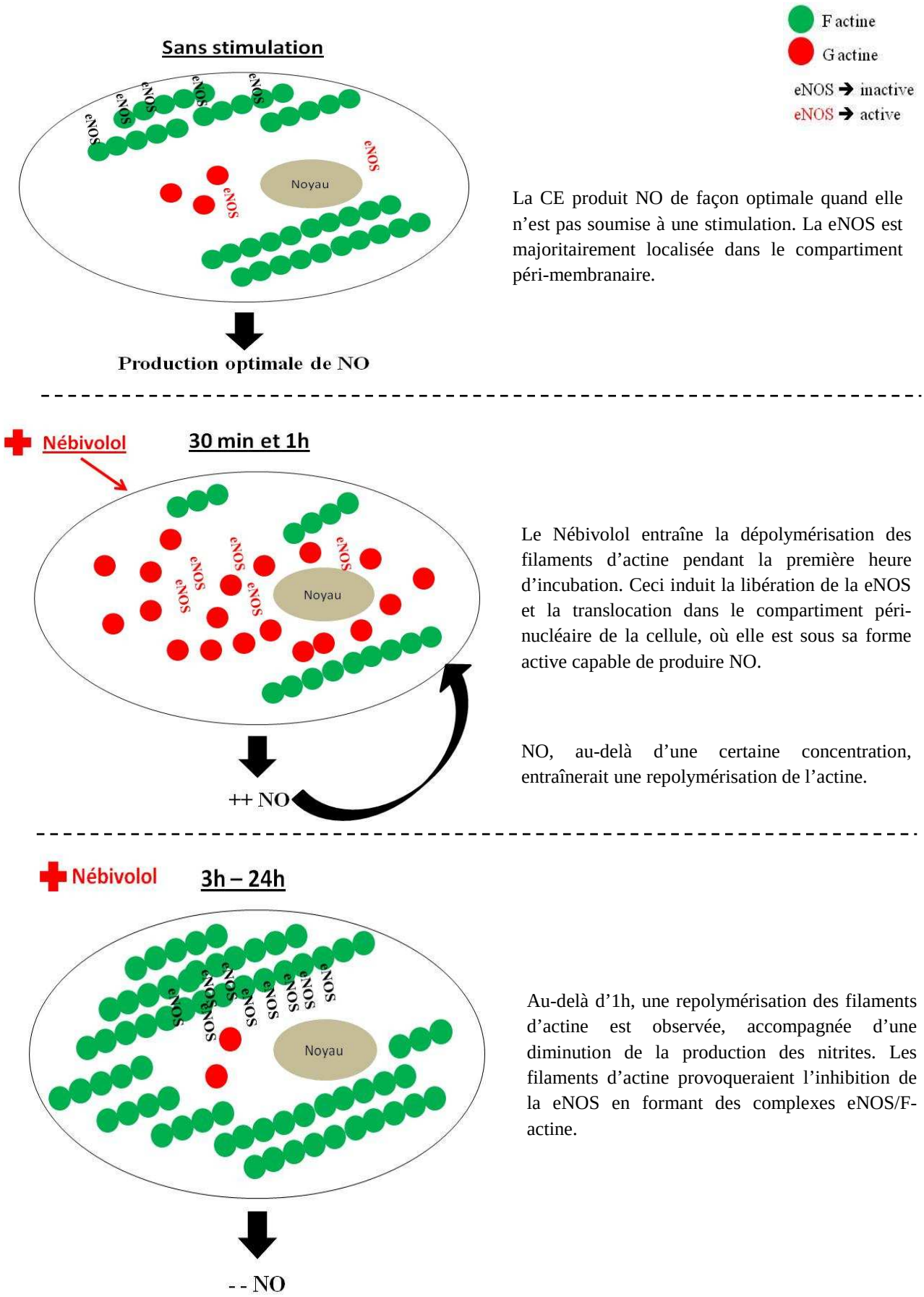


Figure 45 : le mode d'action du Nébivolol implique les modifications au niveau de la structure du cytosquelette d'actine et provoque la translocation péri-nucléaire de la eNOS.

Rappelons qu'après 24h d'incubation avec le Nébivolol, la eNOS est localisée dans la région péri-nucléaire. Nous avons alors suggéré qu'elle pouvait rester péri-nucléaire mais fixée sur les fractions membranaires ou l'appareil de Golgi, ce qui la rendrait inactive. Par les techniques de marquage immunofluorescent et de western blotting, nous allons vérifier l'activité de cette enzyme par l'étude de sa phosphorylation sur le site Ser^{1177} au cours du temps. Cette étude devrait permettre à la fois d'élucider le problème de la localisation/activité de la eNOS et d'étudier d'une manière directe son implication dans la voie d'action du Nébivolol.

Contrôle 2

Implication de la eNOS dans la voie d'action du Nébivolol

2-1 Impact du NEB sur la phosphorylation de la eNOS au cours du temps

Dans cette partie, nous avons dans un premier temps suivi la cinétique de phosphorylation de la eNOS par les techniques de marquage immunofluorescent en utilisant un anticorps primaire spécifique de la eNOSp (Ser^{1177}). En effet, la phosphorylation de ce site est responsable de l'activation de l'enzyme, et la kinase qui en est responsable est la Akt (Michell et al., 1999 ; Ming et al., 2002) (cf. chapitre I ; V.4). Cette étude est menée principalement afin de vérifier l'état d'activité de la eNOS après 24h de culture avec le Nébivolol, et aussi pour évaluer son activité pendant la première heure de culture ; ceci afin de mieux comprendre l'implication du Nébivolol dans l'activation de la eNOS. La phosphorylation de la eNOS a été mesurée par quantification de l'intensité de fluorescence par unité de pixel sur 100 cellules au total issues de trois expériences. Pour cette technique, la cinétique de phosphorylation a été suivie à 30min, 1h, 3h, 5h, 15h et 24h.

La figure 46 rassemble les résultats de marquage immunofluorescent de la eNOSp (grandes images) et de la eNOS (petites images) au cours du temps ; les histogrammes montrent l'étude des populations cellulaires qui est relatif au niveau d'expression de la eNOSp en présence (population C) ou non (population B) de Nébivolol. Pour les cellules traitées avec le Nébivolol, nous avons aussi marqué la eNOS (petites images). Nous pouvons

constater que, quelle que soit la période d'incubation, la eNOSp est localisée essentiellement dans la région péri-nucléaire.

Après **30min** et **1h** de culture, les histogrammes présentent deux populations bien séparées (figure 46). La population cellulaire traitée avec le Nébivolol est décalée sur la droite de l'histogramme par rapport aux cellules non traitées, traduisant une augmentation dans l'intensité de fluorescence correspondant à une augmentation dans la phosphorylation de la eNOS ; cette réponse englobe quasiment 100% des cellules. Le marquage de la eNOS dans les cellules traitées montre en effet une translocation dans la région péri-nucléaire, mais cependant avec une faible expression comme nous pouvons le voir sur les images. Ceci semble logique étant donné que l'enzyme est en grande partie phosphorylée, et que l'anticorps ne reconnaît que la eNOS non phosphorylée.

Après **3h** de culture, les deux populations cellulaires se superposent, traduisant une expression similaire de eNOSp dans les deux conditions de culture. Parallèlement, on observe une augmentation de l'expression de la eNOS non phosphorylée dans les cellules traitées.

A partir de **5h**, une petite proportion de la population cellulaire traitée avec le Nébivolol se décale sur la gauche du témoin, traduisant une diminution dans l'expression de la eNOSp. On retrouve, essentiellement à 24h, une forte expression de la eNOS avec toujours une localisation péri-nucléaire.

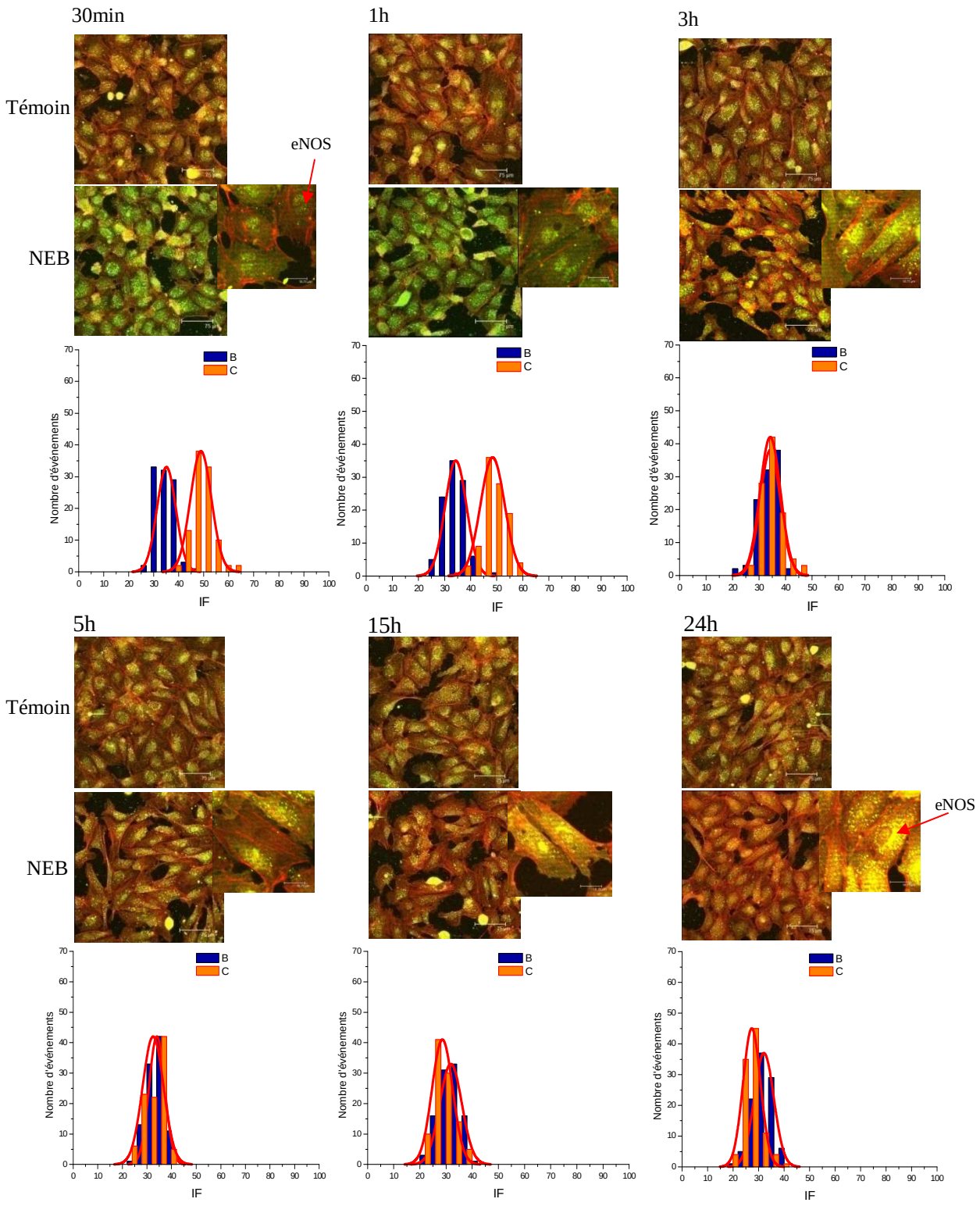


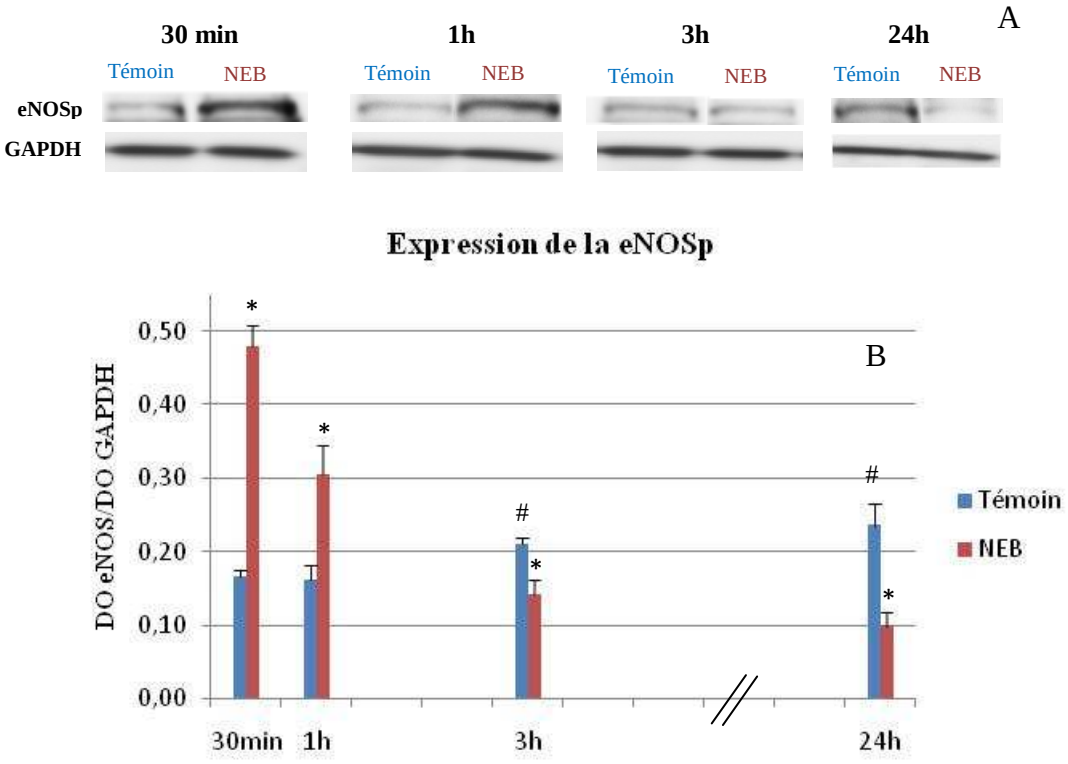
Figure 46 : expression de la eNOSp par les CE au cours du temps en présence ou non de Nébivolol. L'intensité de fluorescence a été mesurée par un logiciel de traitement d'image sur 100 cellules pour chaque temps et les résultats sont exprimés en unités d'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'événements. En vert apparaît la eNOSp, et en rouge le cytosquelette d'actine marqué à la phalloïdine Alexa® 594. Le Nébivolol augmente la phosphorylation de la eNOS pendant la première heure d'incubation dans la totalité des cellules et la diminue à partir de 3h (témoin, NEB). **Les petites images représentent la localisation intracellulaire de la eNOS au cours du temps.** La eNOS est transloquée dans le compartiment péri-nucléaire pendant la première heure d'incubation et conserve cette localisation jusqu'à 24h. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

Dans l'étape suivante, nous avons souhaité conforter les résultats obtenus avec le marquage immunofluorescent avec une autre technique, plus appropriée à l'étude des phénomènes de phosphorylation enzymatique lors de stimulations mécaniques ou biochimiques, qui est le western-blotting. Pour cette étude, nous avons uniquement sélectionné les temps 30min, 1h (période d'activité du Nébivolol sur la structure du cytosquelette d'actine et sur la production de NO), 3h (période d'interruption du signal) et 24h pour vérifier l'activité de la eNOS à ce moment.

La figure 47-a expose les résultats de l'expression de la eNOSp en réponse au Nébivolol par western blotting après 30 min, 1h, 3h et 24h de culture. Cette expression a été mesurée par la quantification de la densité optique des bandes correspondant à la eNOSp et rapportée à celle de la GAPDH qui, dans ces conditions de culture, est d'expression constante. Les résultats sont exprimés sous forme de graphiques dans la figure 47-b qui révèle une augmentation importante dans l'expression de la eNOSp à 30 min et 1h de culture par rapport à leurs témoins ; cette expression chute considérablement à 3h et 24h par rapport à leurs témoins. Nous constatons également une augmentation dans l'expression de la eNOSp dans les témoins à 3h et 24h par rapport à 30 min et 1h, résultat qui n'est pas observé dans le cas du marquage immunofluorescent de la eNOSp. En effet, dans les cytogrammes de la figure 46, la population cellulaire correspondant au témoin (B) se situe toujours entre 20 et 40 unités arbitraires de fluorescence dans toutes les périodes d'incubation.

Les résultats du western blotting donnent le même profil que celui du marquage immunofluorescent pour la cinétique de phosphorylation de la eNOS au cours du temps en présence de Nébivolol, mais révèle cependant des valeurs beaucoup plus significatives. Il est à noter que la technique du western blotting est plus sensible que la quantification de l'intensité de fluorescence pour détecter les variations d'expression d'une protéine, du fait qu'elle prend en considération la totalité des cellules de la culture par extraction des protéines totales de celle-ci, alors que l'autre technique ne tient compte que de 100 cellules.

L'augmentation de l'expression de la eNOSp dans le témoin au cours du temps, avec en parallèle la diminution de cette expression dans les cellules traitées avec le Nébivolol à 3h pourraient expliquer la chute de la production des nitrites retrouvée entre 1h et 3h de culture par rapport au témoin (cf. figure 42).



<u>Figure 47 :</u> expression de la eNOSp après 30 min, 1h, 3h et 24h de culture en présence ou non de Nébivolol ; étude réalisée par western blotting et résultats exprimés par unité arbitraire de densité optique rapportés à l'expression de la GAPDH pour chaque condition. Pendant la première heure de culture en présence de Nébivolol, l'expression de la eNOSp augmente par rapport au témoin ; à partir de 3h cette expression diminue pour atteindre la moitié de la valeur du témoin à 24h. (*p< 0,0001 versus témoin, #p< 0,01 versus témoin à 30 min, N = 3).

<u>Conclusion 5</u>

Le Nébivolol possède bien une action précoce, non seulement sur le cytosquelette d'actine, mais aussi sur la translocation et la phosphorylation de la eNOS. Cette action se déroule au cours de la première heure d'administration et, après 24h d'incubation, la eNOS, bien que localisée dans la région péri-nucléaire, est en grande majorité non phosphorylée, donc inactive. Sur la figure 48 sont résumés les résultats montrant le lien entre ces trois éléments : cytosquelette d'actine, phosphorylation de la eNOS et production des nitrites. Nous constatons clairement la relation inverse entre la formation de filaments d'actine et la production de NO. Le profil de ce dernier suit celui de la phosphorylation de la eNOS, indiquant que NO produit en réponse au Nébivolol provient de l'activation de la eNOS, preuve de son implication dans le mode d'action du Nébivolol. Pour confirmer davantage cette observation, nous avons souhaité vérifier si l'inhibition de la eNOS, mais en présence de Nébivolol, affecterait la production de NO.

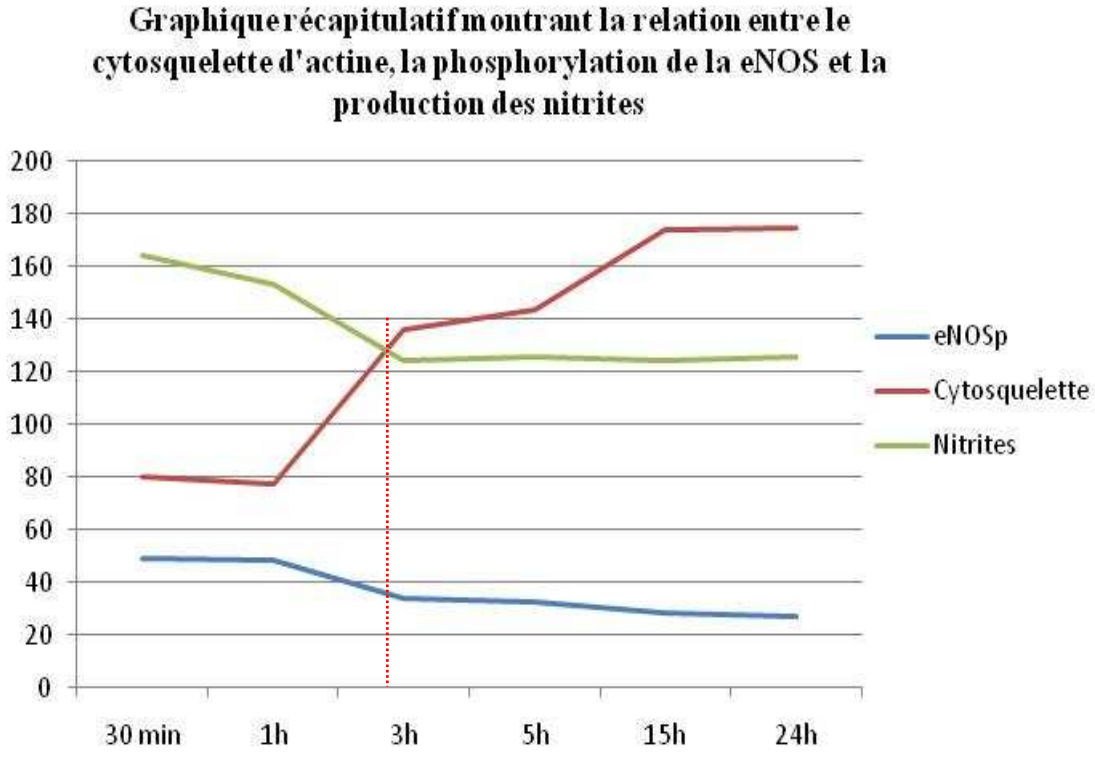


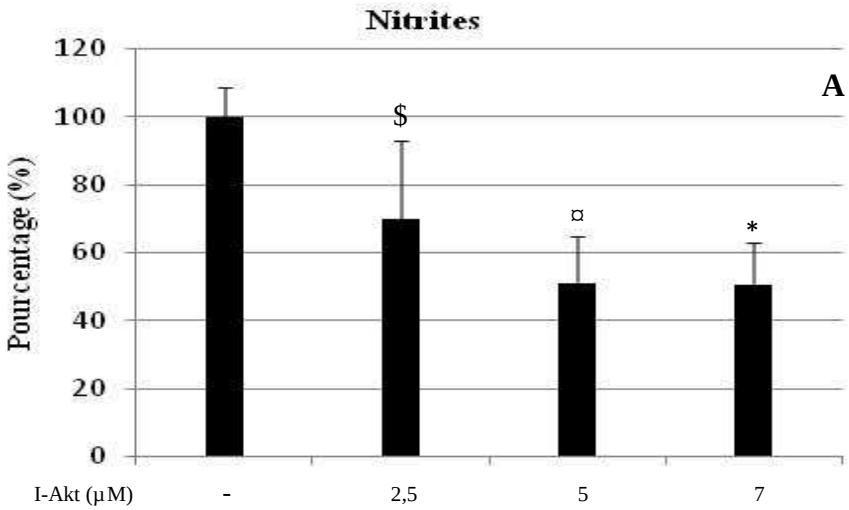
Figure 48 : relation entre l'expression des fibres de stress, la phosphorylation de la eNOS et la production des nitrites. Le graphique montre la relation inverse entre la production des nitrites et l'expression des fibres de stress. Le profil de phosphorylation de la eNOS suit le profil de production des nitrites.

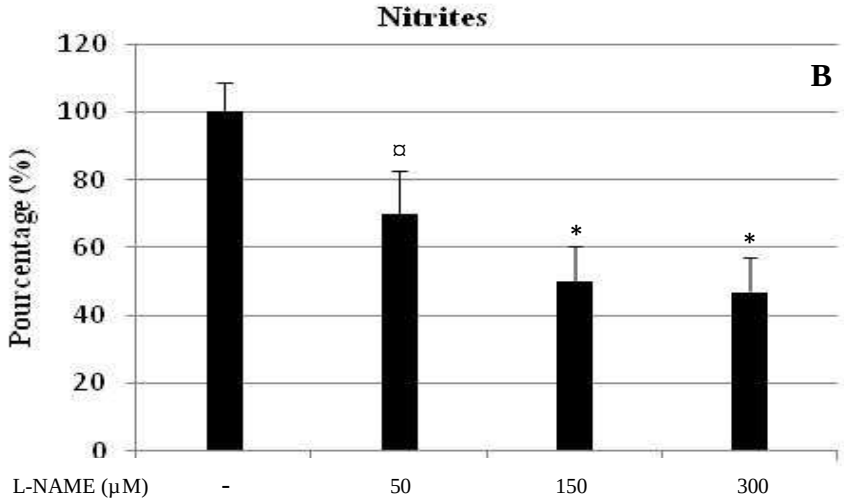
Bien que la majorité des données bibliographiques rapporte que le Nébivolol active la eNOS, récemment, Maffei et al., (2007) ont proposé un nouveau mécanisme impliquant la iNOS au niveau du cœur. Ces auteurs ont rapporté que l'inactivation de cette enzyme inhibait la production de NO normalement induite par le Nébivolol. Nous avons donc voulu vérifier l'éventuelle induction de l'expression de la iNOS par le Nébivolol.

Nous allons dans un premier temps confirmer l'implication de la eNOS dans le mode d'action du Nébivolol, puis dans un deuxième temps, évaluer celui de la iNOS.

2-2 Impact de l'action du Nébivolol lors d'une inhibition de la voie de la eNOS

Nos résultats ont révélé que le Nébivolol induit la dépolymérisation des filaments d'actine, la translocation et la phosphorylation de la eNOS en même temps qu'il induit l'augmentation de la production de NO. Pour confirmer l'implication du Nébivolol dans l'activation de la eNOS, nous avons inhibé cette dernière de deux façons : soit en utilisant un analogue spécifique de son substrat, L-NAME, qui constitue un inhibiteur réversible de la eNOS, soit en inhibant la phosphorylation de l'enzyme par inhibition de la Akt à l'aide d'un inhibiteur spécifique (I-Akt). Avant de rechercher l'action potentielle de ces inhibiteurs en présence de Nébivolol, nous avons d'abord souhaité déterminer les concentrations optimales, le critère de choix de ces paramètres étant leur efficacité dans la réduction de la production des nitrites. Pour ce faire, nous avons évalué l'effet de trois d'entre elles, dont l'activité inhibitrice a déjà été rapportée dans la littérature sur une culture d'HUVEC (Zhu et al., 2003 ; Isenberg et al., 2005). Les résultats (figure 49) montrent une diminution du pourcentage des nitrites dans les cellules cultivées en présence de l'un ou l'autre des inhibiteurs par rapport au témoin. Cette diminution est plus importante à 5 et 7µM d'I-Akt (A), et 50 et plus particulièrement 150 et 300µM de L-NAME (B) où elle atteint 50% par rapport au témoin. L'effet inhibiteur observé avec 2,5µM d'I-Akt ou 50µM de L-NAME étant moins important, nous avons retenu les concentrations de 5µM pour l'inhibiteur Akt et 300µM pour le L-NAME pour la suite de nos travaux.





<u>Figure 49 :</u> recherche de la concentration optimale des inhibiteurs de la Akt (A) et de la eNOS (L-NAME) (B) par l'étude de leur effet sur la production des nitrites après 24h d'incubation avec des CE. L'inhibition de la Akt ou de la eNOS entraîne une diminution de la production des nitrites de façon dépendante de la concentration de l'inhibiteur utilisé. ($p< 0,05 versus témoin, ¤p< 0,001 versus témoin, *p< 0,0001 versus témoin, N = 6).

La figure 50 présente les résultats de la production des nitrites par le Nébivolol suite à l'inhibition de la eNOS après 30min (A) et 24h de culture (B). Les pourcentages de production sont calculés en fonction du témoin négatif (CE sans Nébivolol et sans inhibiteurs = 100%).

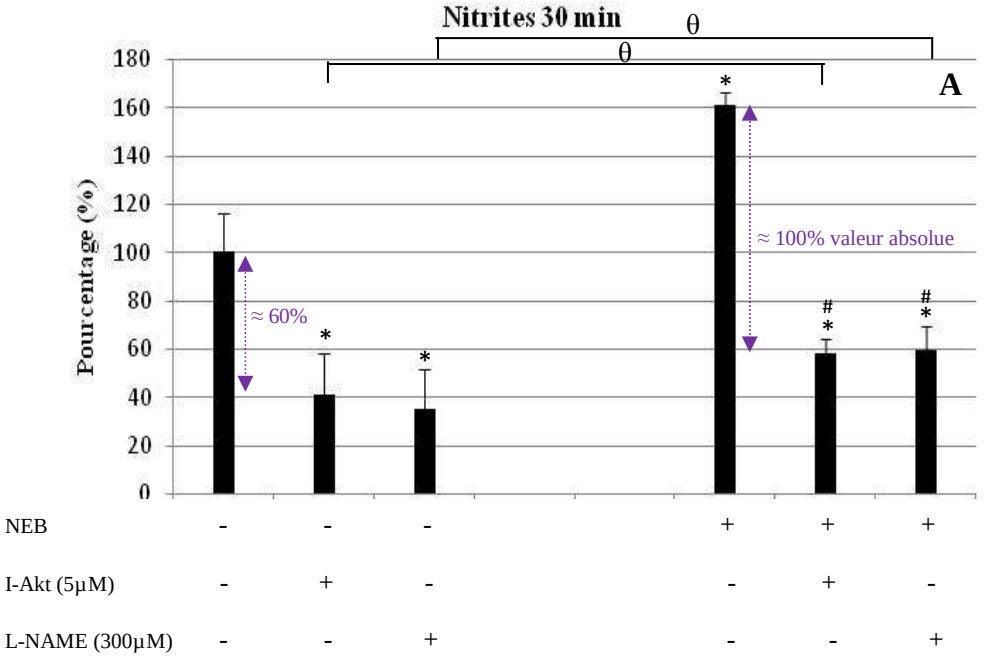
Après 30min de culture en présence de Nébivolol, nous retrouvons le même résultat que précédemment, à savoir une importante augmentation dans la production des nitrites par rapport au témoin négatif. L'inhibition de la eNOS ou de la Akt en l'absence de Nébivolol, entraîne une diminution dans la production des nitrites par rapport à ce témoin. En présence de Nébivolol, cette diminution est significativement réduite avec les deux inhibiteurs. Enfin, la comparaison de la production des nitrites entre les cellules traitées avec les inhibiteurs en présence de Nebivolol et celles traitées avec le Nébivolol seul révèle une diminution très importante passant de 160% à 60%, à la suite de l'inhibition.

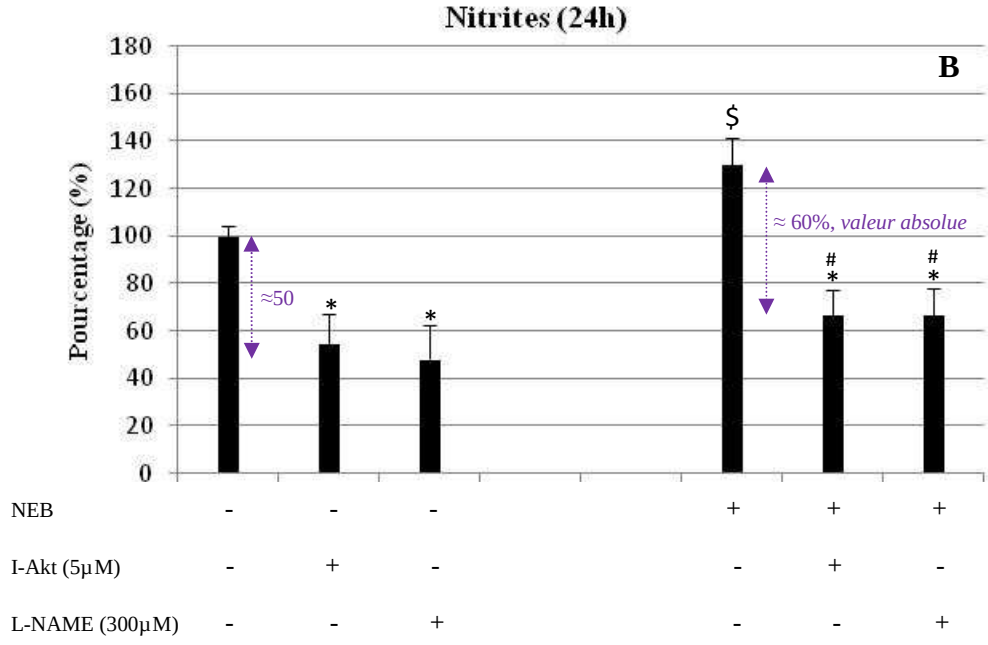
Dans le but de vérifier si la Akt est la principale kinase impliquée par le Nébivolol pour phosphoryler la eNOS, l'impact de son inhibition sur la phosphorylation de la eNOS induite par le Nébivolol après 30 min de culture a été recherché par western blotting. Les résultats sont comme précédemment exprimés sous forme de graphiques quantifiant la densité optique des bandes correspondant à la eNOSp et rapportés à l'expression de la GAPDH qui, dans nos conditions de culture, maintient une expression constante (figure 51). Comme il a déjà été mentionné, le Nébivolol entraîne une augmentation dans l'expression de la eNOSp après 30 min d'incubation. Une diminution très importante de cette phosphorylation est observée après l'inhibition de la Akt en présence de Nébivolol par rapport aux cellules incubées avec le Nébivolol seul.

Après 24h de culture (figure 50-B), nous retrouvons, comme dans les résultats précédents, une augmentation dans la production des nitrites en présence de Nébivolol par rapport au témoin négatif. Cependant, la différence de production entre Nébivolol et témoin à 24h (50%) est inférieure à celle obtenue à 30min (60%). L'inhibition de la eNOS ou de la Akt en l'absence de Nébivolol, abaisse la production des nitrites par rapport au témoin. La comparaison de la production des nitrites entre les cellules traitées avec les inhibiteurs en présence de Nebivolol et celles traitées avec le Nébivolol seul révèle que les inhibiteurs diminuent la production des nitrites. De la même manière, la différence de production entre Nébivolol + inhibiteurs/Nébivolol à 30min (≈ 100%, valeur absolue) est inférieure à celle obtenue à 30min (≈ 60%, valeur absolue).

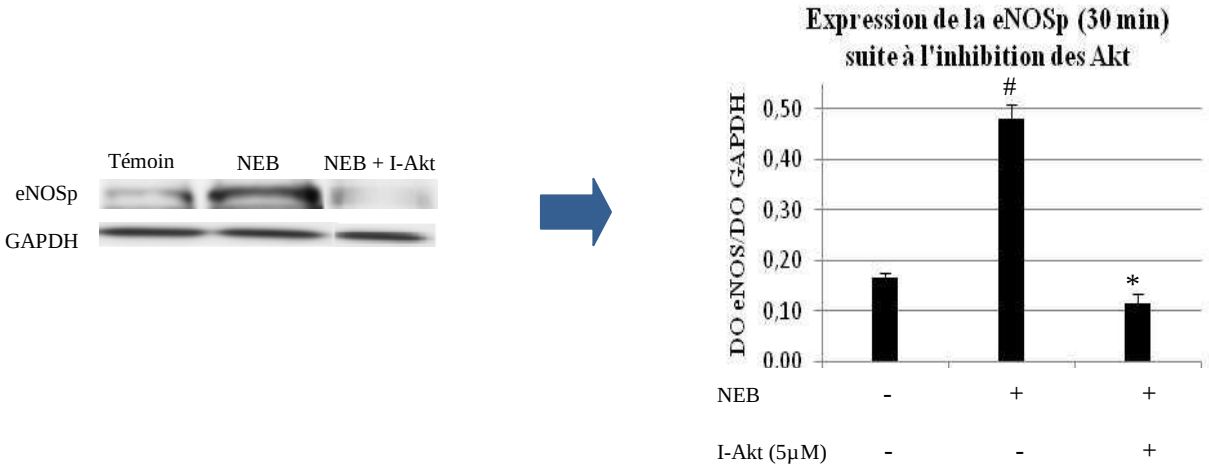
À la lumière de ces résultats, nous constatons :

- ✓ Que le mode d'action du Nébivolol est bel et bien dépendant de la eNOS, impliquant principalement la Akt dans la phosphorylation de cette enzyme. En effet son inhibition entraîne d'une part l'absence de la phosphorylation de la eNOS induite par le Nébivolol comme le montrent les résultats du western blotting, d'autre part l'inhibition de la Akt réduit la production des nitrites d'un niveau similaire à l'inhibition de la eNOS elle-même.
- ✓ Que l'efficacité des inhibiteurs diminue avec le temps puisqu'à 30min le pourcentage absolu d'inhibition est de 100% en comparaison avec les cellules incubées avec le Nébivolol seul et qu'à 24h, il est réduit à 60%.





<u>Figure 50 :</u> effet de l'inhibition de la Akt ou de la eNOS (L-NAME) sur la production des nitrites par les CE en présence ou non de Nébivolol, après 30min (A) et 24h (B) d'incubation. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D système, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage de production par rapport au témoin négatif (CE en l'absence de Nébivolol =100%). L'inhibition de la Akt ou la eNOS entraîne une diminution importante dans la production des nitrites en l'absence et en présence de Nébivolol. (*p< 0,0001 versus témoin négatif, #p< 0,0001 versus NEB, $p< 0,05 versus témoin, θp<0,05, N = 9).



<u>Figure 51 :</u> effet de l'inhibition des Akt sur la phosphorylation de la eNOS induite par le Nébivolol après 30 min de culture. L'expression de la eNOSp est réalisée par western blotting et les résultats sont exprimés par unité arbitraire de densité optique et rapportés à l'expression de la GAPDH pour chaque condition.
L'inhibition des Akt, inhibe l'action du Nébivolol sur la phosphorylation de la eNOS. (#p<0,0001 versus témoin, *p< 0,0001 versus NEB, N = 3).

2-3 <u>Implication éventuelle de la iNOS par le Nébivolol dans sa voie d'action</u>

Dans l'étape précédente, nous avons évoqué les travaux de Maffei et al., (2007) qui ont décrit un mécanisme impliquant la iNOS dans la voie d'action du Nébivolol au niveau du cœur. Dans notre étude, nous avons apporté plusieurs arguments impliquant la eNOS dans l'activité de cette molécule au niveau de la CE. Afin de nous assurer que la eNOS est la seule isoforme responsable de la production de NO en réponse au Nébivolol, nous avons souhaité vérifier en plus l'éventuelle implication de la iNOS.

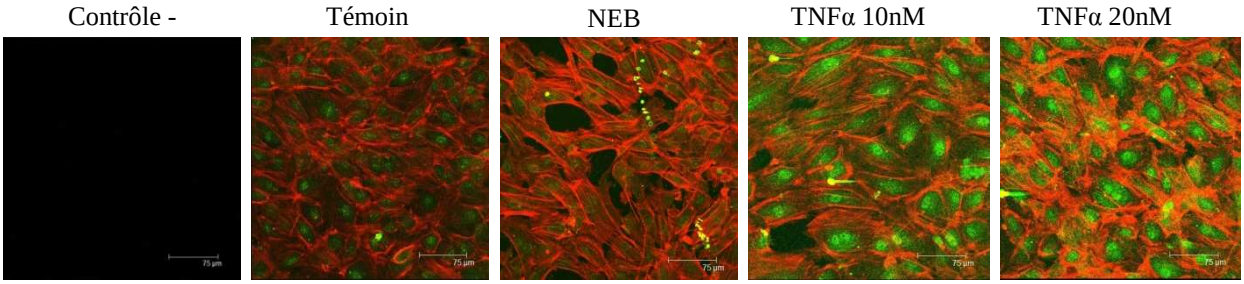
La iNOS peut être exprimée dans les CE en cas d'inflammation en réponse à des cytokines inflammatoires telles que : IL1 et 6, TNFα, LPS,… C'est la seule isoforme des NOS en dehors de la eNOS, susceptible de produire NO dans les CE. Afin de nous assurer que NO produit en réponse au Nébivolol provient uniquement de la eNOS sans impliquer la iNOS, nous avons vérifié, par les techniques de marquage immunofluorescent, l'expression de la iNOS dans des cellules cultivées pendant 24h en présence de Nébivolol. Nous avons choisi 24h d'incubation afin de nous affranchir de toute la période d'incubation employée dans cette étude, qui est de 24h au maximum. En effet, si la iNOS n'est pas exprimée après 24h, elle

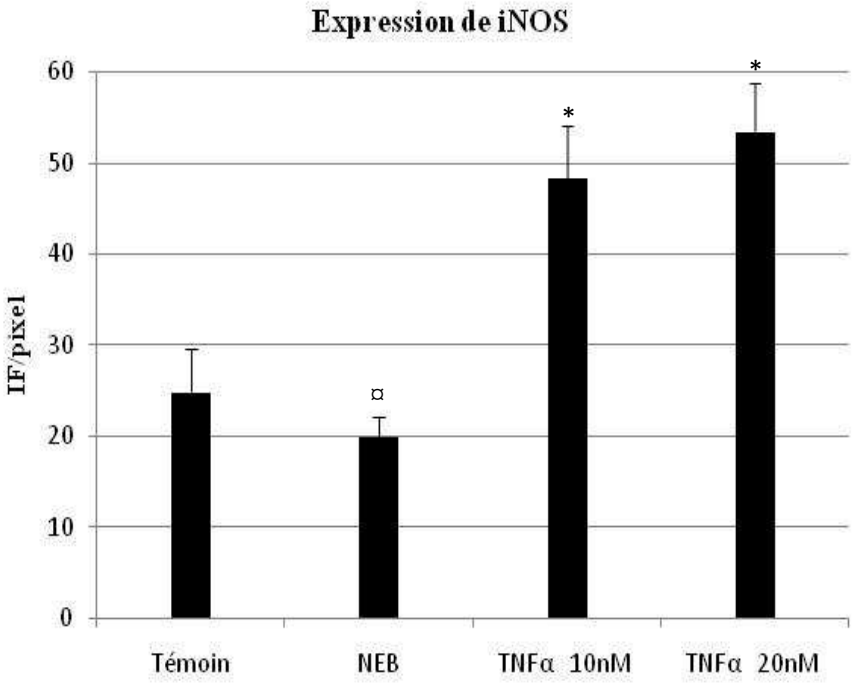
n'est probablement pas présente à 30min ou 1h. Nous avons pris pour témoin positif des CE incubées avec deux concentrations différentes de la cytokine inflammatoire TNFα (10 et 20nM). En effet, à ces concentrations, l'efficacité de cette cytokine à induire une réaction inflammatoire a déjà été validée au laboratoire sur des HUVECs (thèse : Gaucher., 2007).

Les résultats exprimés dans la figure 52 présentent les images de marquage immunofluorescent de la iNOS (vert) et du cytosquelette d'actine (rouge) des cultures en présence ou non de Nébivolol et de TNFα. Le contrôle négatif représente les cellules incubées avec seulement l'AC secondaire afin de vérifier l'éventuelle aspécificité du marquage qui, d'ailleurs, ne révèle aucune fixation non spécifique de l'AC. L'intensité de fluorescence par unité de pixel a été mesurée comme précédemment et présentée par un histogramme. L'image correspondant au témoin révèle, contrairement à ce que nous attendions, une expression de la iNOS. Toutefois cette expression semble atténuée en présence de Nébivolol. Les CE ne devraient pas exprimer la iNOS dans les conditions normales ; nous supposons donc que cette expression pourrait provenir d'un stress lors de la mise en culture des cellules et pourrait s'apparenter à un artéfact de mesure. Le contrôle positif avec le TNFα montre en effet l'induction de l'expression de la iNOS par cette cytokine par rapport aux témoins négatif et positif.

Ces résultats nous permettent de constater :

- ✓ Que le Nébivolol n'induit pas de réaction inflammatoire dans les CE, bien au contraire qu'il semble même l'atténuer.
- ✓ Que la iNOS n'est pas impliquée dans le mode d'action du Nébivolol.





<u>Figure 52 :</u> expression de la iNOS dans des CE incubées pendant 24h avec le Nébivolol. L'expression de la iNOS a été mesurée par marquage immunofluorescent (vert) ; en rouge apparaît le cytosquelette d'actine marqué à la phalloïdine Alexa® 594. L'observation a été réalisée par microscopie confocale et l'intensité de fluorescence a été quantifiée à l'aide d'un logiciel de traitement d'images sur 100 cellules pour chaque condition. Le Nébivolol n'entraîne aucune expression de la iNOS par rapport au témoin, au contraire du TNFα qui entraîne l'expression de celle-ci. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (*p< 0,0001 versus témoin, ¤p<0,001 versus témoin, N = 9).

Discussion

Dans cette partie, nous avons approché de deux façons l'impact du Nébivolol dans la voie d'action de la eNOS. Tout d'abord nous avons suivi la translocation et la phosphorylation de l'enzyme au cours du temps, puis nous l'avons inhibée soit par le L-NAME qui est un analogue de son substrat (L-arginine), soit par l'inhibition de la Akt (kinase responsable de son activation). Nos résultats, en accord avec la littérature, montrent que le Nébivolol induit la phosphorylation de la eNOS sur le site Ser^{1177} (Gosgnach et al., 2001) et que l'inhibition de la eNOS avec le L-NAME ou par l'inhibiteur des Akt altère l'action du Nébivolol sur la production des nitrites (Kakoki et al., 1999 ; Broeder et al., 2000 ; Parenti et al., 2000 ; Gosgnach et al., 2001 ; De Groot et al., 2003 ; Zhu et al., 2003 ; Dessy et al., 2005). Néanmoins, il est important de noter qu'à 30 min, l'incubation des cellules avec l'un ou l'autre des inhibiteurs, réduit la production des nitrites (figure 50-A), et que cet effet inhibiteur est réduit lorsqu'on met l'inhibiteur en présence de Nébivolol. Ces résultats sont conformes à ceux d'une étude menée par Zhu et al., (2003), qui avaient constaté une diminution dans la production de NO semblable à la nôtre après avoir traité des HUVEC avec du L-NAME en présence ou non de Nébivolol.

Cette réduction dans l'action des inhibiteurs en présence de Nébivolol pourrait être due à un phénomène de compétition sur l'enzyme entre le substrat L-arginine et l'inhibiteur L-NAME. Rappelons que ce substrat forme, tout comme la eNOS, des complexes avec les filaments d'actine (Zahrikov et al., 2000). Le Nébivolol, en entraînant la dépolymérisation de la structure du cytosquelette d'actine, augmenterait probablement la quantité de substrat L-arginine présentée à l'enzyme et donc la quantité du substrat dépasserait celle de L-NAME, d'où cette petite différence entre les cellules traitées avec les inhibiteurs en présence ou non de Nébivolol. En ce qui concerne l'I-Akt, cette différence pourrait être due à la phosphorylation de la eNOS par une autre kinase de la famille des PKB, le résultat du western blotting (figure 51) étant susceptible de conforter cette suggestion étant donné que l'inhibition de la Akt en présence de Nébivolol abaisse l'expression de la eNOSp à un niveau proche du témoin et donc ne l'inhibe pas totalement. En d'autres termes, même si l'Akt est inhibée, il existe toujours un taux d'expression basale de eNOSp dans les cellules. Toutefois, si cette hypothèse était vraie, cette autre kinase ne jouerait qu'un rôle minime dans la phosphorylation de la eNOS puisque la réponse la plus importante semble être due aux Akt.

Toujours dans un souci de confirmer que la eNOS est la seul isoforme impliquée dans la voie d'action du Nébivolol, nous avons contrôlé, par marquage immunofluorescent, l'éventuelle expression de la iNOS en prenant des cellules incubées avec du TNFα comme témoin positif (figure 52). Nous avons constaté que le Nébivolol atténue l'expression basale de la iNOS retrouvée dans le témoin négatif, indiquant que son action est totalement indépendante de cette enzyme. En effet, dans la bibliographie, l'inhibition de la iNOS n'a aucun effet sur la production de NO induite par le Nébivolol (Kalinowski et al., 2003). Maffei et al., (2007) n'étaient pas de cet avis. Ils ont observé une diminution dans la production de NO dans des coupes de cœur traitées avec du Nébivolol après avoir inhibé la iNOS avec un inhibiteur spécifique (L-NIL). Nous suggérons que cette différence dépend probablement du type de l'échantillon utilisé, les CE isolées à partir de vaisseaux ne réagissant pas aux stimulations de la même manière que les cellules cardiaques. Au total, dans notre étude, le Nébivolol ne semble pas impliquer la iNOS dans son mode d'action.

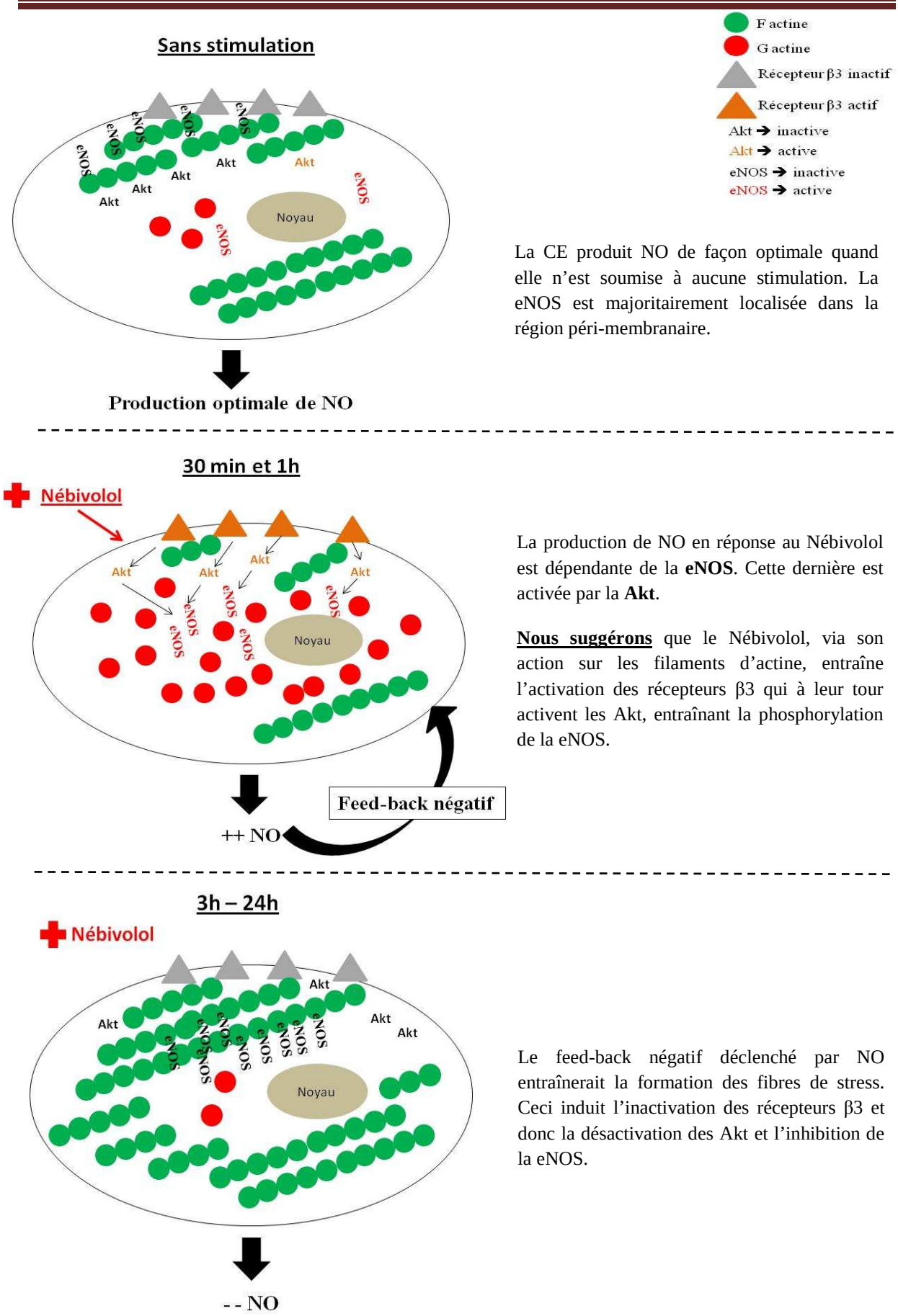
Conclusion 6

Au vu des résultats présentés jusqu'ici, nous pouvons supposer que l'action du Nébivolol implique entièrement la voie d'activation de la eNOS. La phosphorylation de cette enzyme est gérée par l'activation de la voie des Akt (PKA, PI3K, Akt) et n'est possible qu'en réponse à la translocation de l'enzyme qui se déroule pendant la première heure d'incubation avec le Nébivolol. La translocation est sans doute consécutive à la dépolymérisation des filaments d'actine et de l'actine corticale observée au cours de cette période. À partir de 3h d'incubation, le signal est atténué, probablement à la suite de la repolymérisation de l'actine qui serait responsable de la diminution de l'expression de la eNOSp. Ceci constituerait un feed-back négatif déclenché en réponse à une forte production de NO afin de préserver la viabilité cellulaire.

Le mode d'action du Nébivolol dépendrait, selon les résultats ci-dessus, des modifications structurales qu'il engendre sur le cytosquelette d'actine. Dans la littérature, la majorité des recherches effectuées sur le mode d'action de cette molécule révèlent une dépendance des récepteurs adrénergiques β3 :

- ✓ Récemment, l'équipe de Volovyk et al., (2006) à constaté l'existence d'une relation entre l'activité des adrénorécepteurs et le remodelage du cytosquelette d'actine. La stabilisation de la structure du cytosquelette d'actine par un agent spécifique (jasplakinolide) inhibe l'internalisation de ces récepteurs et affecte donc leur activité.
- ✓ D'un autre côté, Gebhardt et al., (2005) ont rapporté que la dépolymérisation des filaments d'actine avec la cytochalasine D entraînait l'activation de ces récepteurs et la production de NO.
- ✓ Gauthier et al., (2007) ont constaté que la stimulation des récepteurs β3 induit l'activation de la PKA, qui est connue pour son rôle dans l'activation de la eNOS via la phosphorylation des PI3K et des Akt.

Il est donc probable que les récepteurs β3 soient impliqués dans la phosphorylation de la eNOS en réponse au Nébivolol. La figure 53 résume l'hypothèse que nous avons pausée. Nous pensons que les récepteurs β3 s'activeraient à la suite de la dépolymérisation des filaments d'actine (Gebhardt et al., 2005), entraînant la phosphorylation des Akt, qui à leur tour phosphorylent la eNOS (Gauthier et al., 2007). Ces récepteurs se désactiveraient lors de la repolymérisation de l'actine, expliquant ainsi la déphosphorylation de la eNOS et la diminution de la production des nitrites observée à partir de 3h de culture en présence de Nébivolol, et qui serait donc due à la déphosphorylation des Akt.



La CE produit NO de façon optimale quand elle n'est soumise à aucune stimulation. La eNOS est majoritairement localisée dans la région péri-membranaire.

La production de NO en réponse au Nébivolol est dépendante de la **eNOS**. Cette dernière est activée par la **Akt**.

Nous suggérons que le Nébivolol, via son action sur les filaments d'actine, entraîne l'activation des récepteurs β3 qui à leur tour activent les Akt, entraînant la phosphorylation de la eNOS.

Le feed-back négatif déclenché par NO entraînerait la formation des fibres de stress. Ceci induit l'inactivation des récepteurs β3 et donc la désactivation des Akt et l'inhibition de la eNOS.

Figure 53 : hypothèse sur le rôle potentiel des récepteurs β3 dans la phosphorylation de la eNOS en réponse au Nébivolol.

La suite de ce travail a été consacrée à la vérification de ces hypothèses. Dans la littérature, les auteurs ayant étudié l'implication des récepteurs β3 dans la voie d'action du Nébivolol l'ont fait en testant la réponse aux différents antagonistes de ces récepteurs sur l'action vasodilatatrice du Nébivolol, essentiellement dans son rôle de production de NO. Ainsi, afin de savoir si les récepteurs β3 interviennent dans la phosphorylation de la eNOS secondaire à la dépolymérisation des filaments d'actine, nous avons, comme ces auteurs, étudié l'impact de l'un de leurs antagonistes, le SR 59230A, sur la production des nitrites en présence de Nébivolol.

Contrôle 3

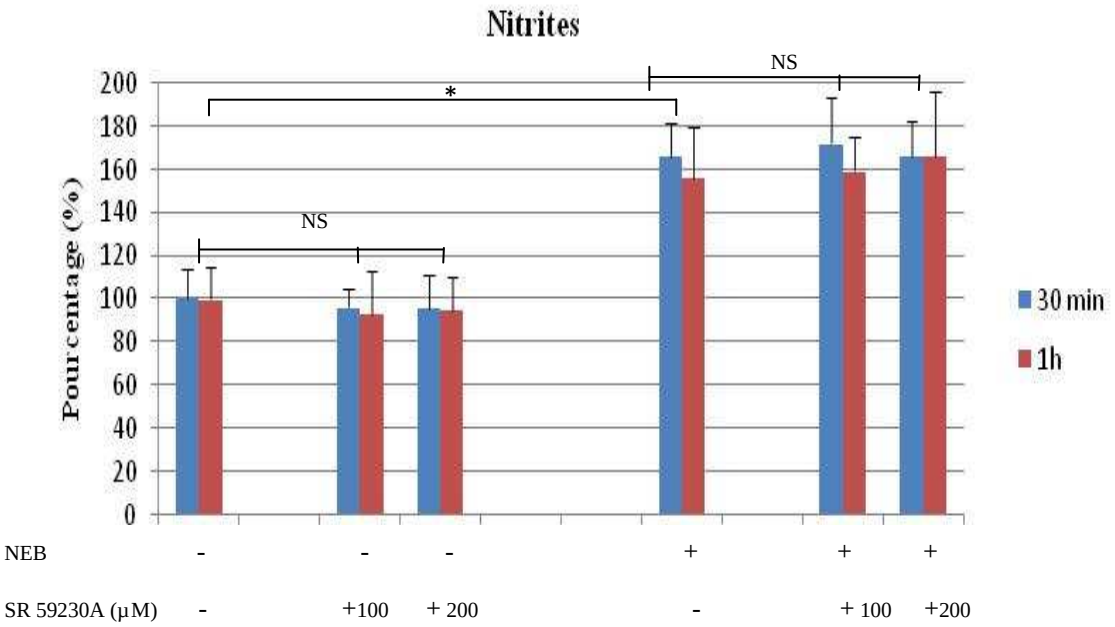
Implication du Nébivolol dans l'action des adrénorécepteurs β3

Est ce que la dépolymérisation du cytosquelette d'actine provoquée par le Nébivolol induit, non seulement la translocation de la eNOS, mais aussi **l'activation des récepteurs β3,** qui vont intervenir au niveau de la phosphorylation de cette enzyme ?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé un antagoniste des récepteurs β3 proposé dans la littérature, le SR59230A, dont nous avons évalué l'impact sur la production des nitrites en présence de Nébivolol. L'étude a été effectuée à 30min et 1h, temps choisis car correspondant à l'implication des récepteurs β3 pendant la durée d'activité maximale du Nébivolol. Nous avons d'abord testé les concentrations de 10, 20 et 50µM (concentrations conseillées par le fournisseur) mais puisqu' aucun effet n'a été observé sur la production de NO (résultats non exposés), nous avons augmenté les concentrations à 100 et 200µM dans l'espoir d'obtenir une réponse positive.

La figure 54 exprime les résultats de dosage des nitrites dans les différentes conditions de cultures (± Nébivolol, ± antagoniste). Contrairement à nos espérances, nous constatons qu'en l'absence de Nébivolol, le blocage des récepteurs β3, que ce soit avec 100 ou 200µM d'antagoniste, n'affecte pas la production des nitrites par rapport au témoin négatif (CE non traitées). Le même résultat est observé en présence de Nébivolol en comparaison cette fois au témoin positif (CE avec le Nébivolol). Ces résultats sont en contradiction avec de

nombreuses références bibliographiques qui rapportent que l'inactivation des récepteurs β3 avec le même antagoniste que le notre ou avec un autre, bloque l'effet vasodilatateur du Nébivolol en inhibant la production de NO (Gosgnach et al., 2001 ; Ladage et al., 2006). Par contre, nos résultats sont en accord avec ceux de Chlopicki et al., (2002) qui ont rapporté que l'effet vasodilatateur est indépendant des récepteurs β3. Evangelista et al., (2007) ont testé, tout comme nous, l'implication des récepteurs β3 dans la production de NO induite par le Nébivolol sur une culture d'HUVEC en utilisant le même antagoniste, et ils montrent que le Nébivolol continue à induire une production de NO en présence de cet antagoniste. Ainsi, la réponse des cellules semble dépendre des conditions expérimentales et de leur provenance. Le mode d'action du Nébivolol semble donc indépendant des récepteurs adrénergiques β3, ce qui veut dire que la phosphorylation de la eNOS n'est pas due à l'activation de ces récepteurs en réponse à la dépolymérisation des filaments d'actine. En d'autres termes, la dépolymérisation de ces filaments doit certainement activer une autre voie de signalisation qui serait responsable de la phosphorylation de la eNOS.



<u>Figure 54 :</u> effet de l'inhibition des adrénorécepteurs β3 sur la production des nitrites par les CE après 30min (bleu) et 1h (rouge) d'incubation en présence ou non de Nébivolol. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D système, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage de production par rapport au témoin négatif (CE en l'absence de Nébivolol = 100%). En l'absence de Nébivolol, l'inhibition des récepteurs β3 n'entraîne aucune diminution dans la production des nitrites par rapport au témoin. De même, l'inhibition de ces récepteurs n'altère pas l'effet du Nébivolol sur la production de NO, (*p< 0,0001 versus témoin négatif, N = 9).

Conclusion 7

Nous avons constaté que l'activité du Nébivolol sur les CE implique la réorganisation du cytosquelette d'actine consistant en une dépolymérisation des filaments pendant la première heure d'incubation. Nous avons ensuite montré que l'augmentation de la production de NO est dépendante de la eNOS du fait de sa translocation, de l'augmentation de sa phosphorylation pendant cette période et de la baisse de la production de NO consécutive à l'inhibition de la eNOS ou de l'Akt. Cependant, l'étude de l'implication des récepteurs β3, révèle que la phosphorylation de la eNOS en réponse au Nébivolol semble indépendante de l'activation de ces récepteurs, contrairement à ce que nous avions pensé. En résumé, la voie d'action du Nébivolol implique le cytosquelette d'actine et la eNOS et est indépendante des récepteurs adrénergiques β3.

En nous basant sur des données bibliographiques, nous avons rapporté la baisse de la production de NO à partir de 3h de culture en présence de Nébivolol à l'augmentation de la formation de fibres de stress, suggérant un feed-back négatif afin de préserver la viabilité cellulaire. En dernière étape de ce travail, nous avons souhaité confirmer que l'inhibition de la eNOS est bien dépendante de la formation des fibres de stress. Pour ce faire, nous avons traité les CE avec deux agents perturbateurs et irréversibles du cytosquelette d'actine : la cytochalasine D et un inhibiteur spécifique de la Rho-kinase, l'hydroxyfasudil, 10 minutes avant de les mettre en présence de Nébivolol, ceci afin d'empêcher la repolymérisation de l'actine. Nous avons ensuite évalué leur impact sur la production des nitrites.

Partie III

Effet du Nébivolol sur l'activité de la eNOS suite à la perturbation de l'organisation du cytosquelette d'actine

La cytochalasine D est une toxine réputée pour ses propriétés d'inhibition de la polymérisation des fibres d'actine (cf. chapitre II ; II.2.2.1). La Rho-kinase est connue pour son rôle dans la régulation de la formation des fibres de stress (Kimura et al., 1996 ; Fukata et al., 2001 ; Tzima et al., 2006). Elle a également été identifiée comme agent régulateur négatif de l'expression et de l'activation de la eNOS (Laufs et al., 1998 et 2000 ; Li et al., 2002 ; Ming et al., 2002) :

- En diminuant la stabilité des ARNm (Eto et al., 2001 ; Rikitake et al., 2005),
- En inhibant la voie de phosphorylation des Akt par inhibition de la PKB (Ming et al., 2002).
- En entraînant la phosphorylation du site Thr^{495} de la eNOS, l'enzyme ainsi phosphorylée est sous forme inactive (Sugimoto et al., 2007).

Avant de procéder, sur nos cultures, aux études de ces molécules, nous avons d'abord recherché les concentrations optimales.

III.1- Choix des concentrations optimales en cytochalasine D et hydroxyfasudil

Une concentration élevée en cytochalasine D ou en hydroxyfasudil pourrait endommager irréversiblement le cytosquelette d'actine et entraîner la mort cellulaire. Le choix des concentrations optimales va dépendre de leur efficacité dans la dépolymérisation des filaments d'actine ainsi que du nombre de cellules nécrotiques qu'elles pourraient induire.

En ce qui concerne la cytochalasine D, nous avons, dans un premier temps, travaillé avec des concentrations semblables à celles trouvées dans la littérature, mais le test de viabilité cellulaire a révélé un taux très élevé de nécrose (résultats non exposés). Nous avons alors testé une gamme de concentrations plus faibles : 5, 10, 20, 50, 100, 200, 1000 nM.

Pour l'hydroxyfasudil, nous avons testé : 20, 50 et 100 µM (concentrations conseillées par le fournisseur).

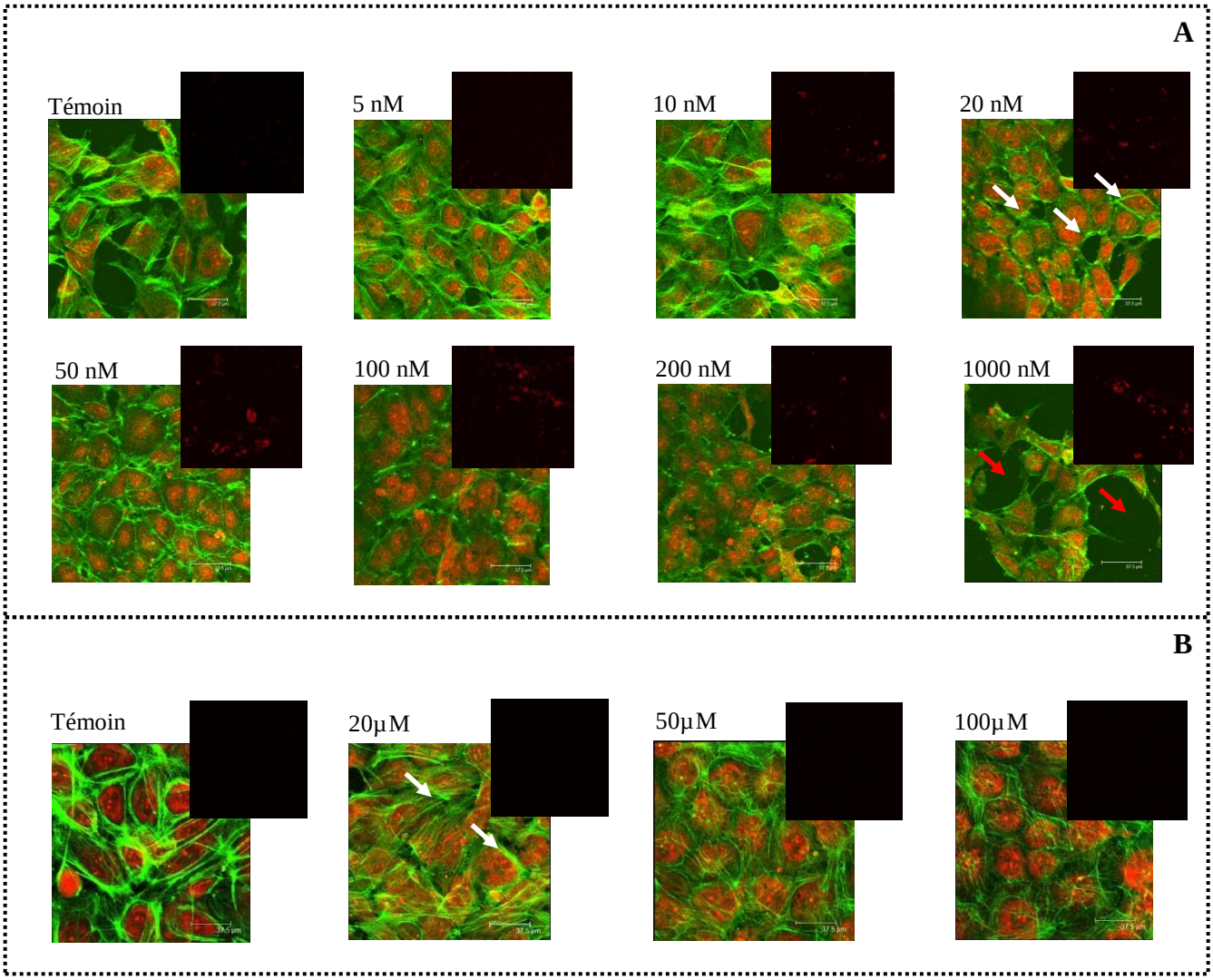
La cytochalasine D et l'hydroxyfasudil ont été dilués dans du milieu de culture complet.

La figure 55 expose les images du cytosquelette d'actine (vert) et du noyau (rouge) des cellules cultivées pendant 24h en présence de cytochalasine D (A) ou d'hydroxyfasudil (B). Les petites images correspondent aux tests de nécrose effectués à l'aide de l'iodure de propidium. Lorsque, sur ces images, apparaissent des noyaux rouges, les cellules sont en phase de nécrose.

À 5 et 10µM, nous observons que la cytochalasine D (figure 55-A) n'entraîne aucune dépolymérisation visible des filaments d'actine. Celle-ci ne commence à apparaître qu'à partir de 20µM. A cette concentration, nous observons une dépolymérisation des filaments d'actine avec cependant la conservation de l'actine corticale (flèches blanches). Le test de nécrose cellulaire révèle l'apparition de quelques cellules nécrotiques dont le nombre augmente avec la concentration de cytochalasine D. A 1000nM, nous observons une dépolymérisation très importante des filaments d'actine allant jusqu'au décrochement cellulaire (flèches rouges).

En ce qui concerne l'hydroxyfasudil (figure 55-B), on observe une dépolymérisation des filaments d'actine dès 20µM, toujours avec une conservation de l'actine corticale et avec un taux de nécrose négligeable pour les trois concentrations testées, sans traces de décrochement cellulaire.

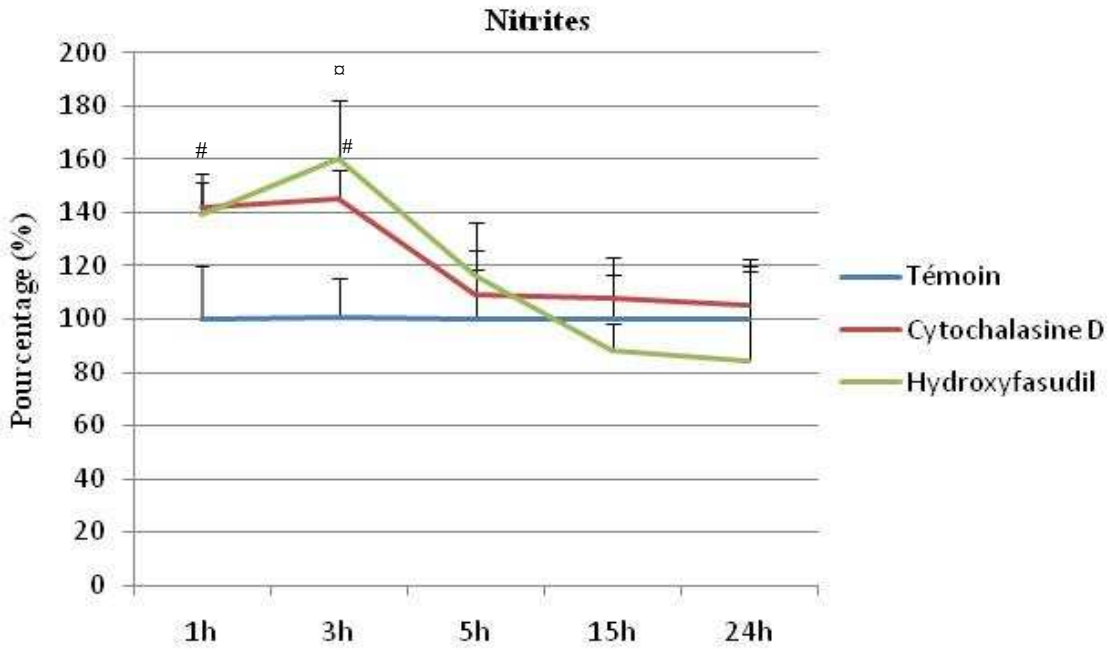
Pour la suite de nos expériences, nous avons choisi les concentrations suivantes : 20nM pour la cytochalasine D et 20µM pour l'hydroxyfasudil, car elles induisent une dépolymérisation des filaments d'actine sans pour autant affecter notablement la viabilité cellulaire.



<u>Figure 55 :</u> mise au point des concentrations de cytochalasine D (A) et d'hydroxyfasudil (B) via l'étude de leur effet sur la dépolymérisation des filaments d'actine ainsi que l'induction d'une nécrose cellulaire. Le cytosquelette d'actine a été marqué grâce à la phalloïdine Alexa® 488. En rouge apparaissent les noyaux marqués à l'iodure de propidium. Ce dernier a également servi pour la réalisation des tests de viabilité (petites images). (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 6).

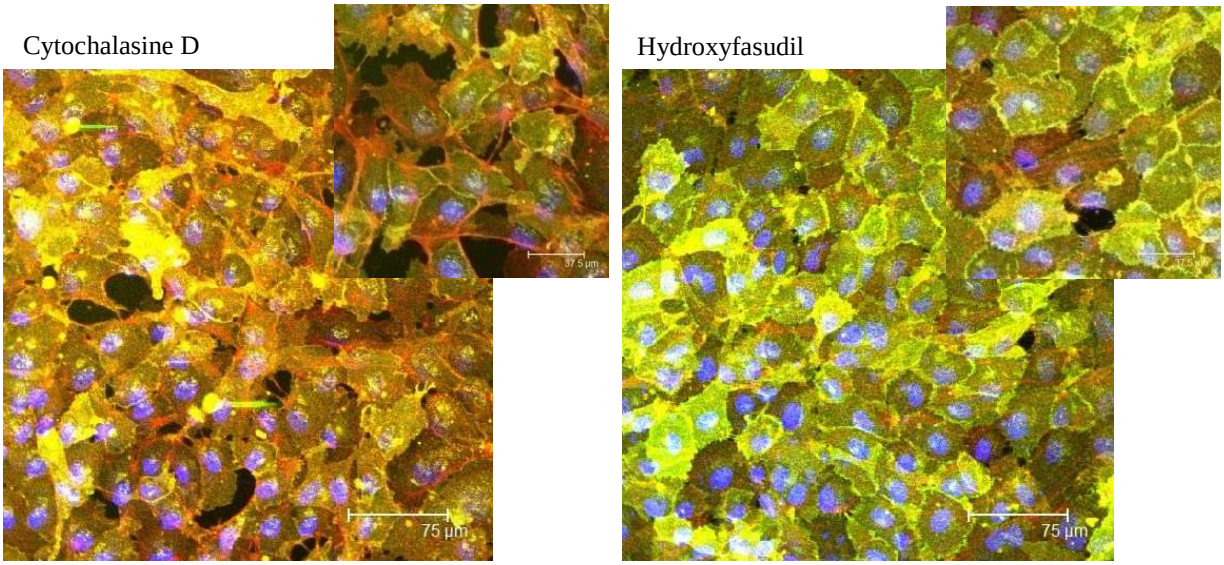
L'impact de la cytochalasine D et de l'hydroxyfasudil sur la production des nitrites a été étudié au cours du temps. La figure 56 révèle une augmentation importante dans la production des nitrites au cours des trois premières heures de culture. Au-delà de cette période, nous observons une diminution dans la production des nitrites. À partir de 5h de culture, aucune différence n'est observée par rapport au témoin. Le profil de ces graphiques se rapproche de celui obtenu avec le Nébivolol (cf. figure 42-B), à la différence qu'avec ce dernier, la diminution de la production des nitrites a été observée à partir d'1h de culture seulement alors qu'en présence de cytochalasine D ou d'hydroxyfasudil, elle a lieu après 3h.

Nos résultats à 1h et 3h de culture avec les éléments perturbateurs du cytosquelette sont en accord avec la littérature, où il a été rapporté à plusieurs reprises que la cytochalasine D et l'hydroxyfasudil augmentent la production de NO (Su et al., 2003 ; Takemoto et al., 2002 ; Sugimoto et al., 2007).



<u>Figure 56 :</u> effet de la perturbation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil sur la production des nitrites au cours du temps. Dosage réalisé à l'aide du réactif de *Griess* (R&D système, France). La perturbation du cytosquelette d'actine entraîne une augmentation dans la production des nitrites pendant les 3 premières heures d'incubation par rapport aux témoins. Au-delà de cette période, la production diminue considérablement. (¤p< 0,001 versus témoin, #p< 0,01 versus témoin, N = 6).

Ces résultats révèlent en outre que la diminution de la production des nitrites à partir de 3h ne peut pas dépendre de la polymérisation des filaments d'actine puisque la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil présents dans le milieu, déstabilisent irréversiblement les filaments d'actine et empêchent la formation des fibres de stress. Ce résultat demeurait sans explication jusqu'à l'étude de la localisation intracellulaire de la eNOS après 24h de culture avec ces molécules (figure 57). Nous avons en effet constaté que l'enzyme est localisée dans le compartiment péri-membranaire de la cellule. Rappelons qu'en présence de Nébivolol, la eNOS, bien qu'inactive (non phosphorylée) est restée péri-nucléaire après 24h de culture. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la production de NO dans la cellule ne dépend pas seulement de la formation de fibres de stress, mais aussi de la translocation péri-membranaire de la eNOS.



<u>Figure 57 :</u> localisation intracellulaire de la eNOS après 24h d'incubation des CE avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil. En vert apparaît la eNOS, en rouge le cytosquelette d'actine marqué à la phalloïdine Alexa® 594, et en bleu apparaissent les noyaux marqués au Hoechst. Les images montrent que la eNOS est localisée dans le compartiment péri-membranaire dans les deux conditions de culture. (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

La formation des fibres de stress se traduit par l'augmentation de l'activité de la Rho-kinase. Cette dernière est bien connue pour son action inhibitrice sur la eNOS. L'enzyme, une fois déphosphorylée sur le site Ser^{1177}, est tout de suite phosphorylée sur le site Thr^{495} par la Rho-kinase et transloquée dans les fractions membranaires (Fleming et al., 2001). Ming et al., (2002) ont rapporté que l'activation de la Rho-kinase est responsable de la déphosphorylation de la eNOS sur le site Ser^{1177} et qu'en même temps, elle diminue son expression en altérant la

stabilité de ses ARNm ; le but de ceci, selon ces auteurs, serait de diminuer à long terme la production de NO. Lorsque la Rho-kinase est inhibée, comme c'est le cas dans notre expérience, les fibres de stress ne se forment pas, mais visiblement, cela n'empêche pas la diminution de la production de NO à partir de 3h d'incubation. Nous pensons donc que cette diminution revient à la translocation péri-membranaire de la eNOS par un mécanisme que nous n'expliquons pas. Ainsi, la cellule pourrait disposer de plusieurs mécanismes de préservation de sa viabilité et de lutter contre une production élevée et continue de NO qui pourrait induire un stress oxydatif entraînant sa mort. Si l'un de ces mécanismes est altéré, comme c'est le cas lors de l'inhibition de la Rho-kinase ou le traitement avec la cytochalasine D, un autre « serait mis en œuvre ».

Il est important de mentionner que la translocation péri-membranaire de la eNOS après 24h de culture avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil reflète la conservation de l'actine corticale en bon état puisque celle-ci fixe la eNOS péri-membranaire (Govers et al., 2001 ; Su et al., 2003). Ceci est probablement dû aux faibles concentrations de cytochalasine D et d'hydroxyfasudil utilisées. Il est donc possible que l'une des causes de la nécrose cellulaire que nous avons observée avec les plus fortes concentrations de cytochalasine D (figure 55-A) revienne à la destruction totale du réseau d'actine dans les cellules, y compris l'actine corticale. Ce résultat met en avant l'avantage de l'action rapide du Nébivolol sur l'altération de l'actine corticale, entre 30 min et 1h, que nous avons précédemment observée. L'avantage du Nébivolol qui ressort de ces résultats est son action **rapide** et **transitoire,** aussi bien sur le cytosquelette d'actine que sur la phosphorylation de la eNOS. Dans le cas contraire, une dépolymérisation prolongée des filaments d'actine aurait entraîné des troubles dans plusieurs mécanismes cellulaires dépendants du cytosquelette d'actine.

Les mécanismes qui régulent la viabilité cellulaire sont multiples et régulés par des voies de signalisation très complexes, le nombre de ces mécanismes et l'ordre dans lequel ils s'activent constituent un vaste domaine de recherche d'avenir.

Une fois l'implication de la polymérisation des filaments d'actine dans l'inhibition de la production de NO étudiée et l'hypothèse que la cellule dispose de plus qu'un mécanisme pour limiter ces productions posée, nous allons à présent vérifier la validité de cette hypothèse sur nos cultures cellulaires en présence de Nébivolol.

III.2- Etat de l'inhibition de la production des nitrites en présence de Nébivolol suite à la déstabilisation du cytosquelette d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil

Une fois les concentrations optimales en cytochalasine D et hydroxyfasudil choisies, nous avons traité les cellules avec chacune de ces molécules pendant 10 min avant d'ajouter le Nébivolol, le but étant d'évaluer l'impact de la perturbation des filaments d'actine sur l'inhibition de la production de NO observée en présence de Nébivolol. Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de ces molécules sur les caractères d'orientation et d'élongation cellulaire précédemment observés après 24h de culture, puis nous avons évalué la production des nitrites par ces cellules et observé la localisation intracellulaire de la eNOS dans ces conditions.

La période intéressante dans cette étude se situant entre 3 et 24h (polymérisation des filaments d'actine et diminution de la production de NO), les expériences avec la cytochalasine D et l'hydroxyfasudil ont été conduites sur une période de 24h afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux du Nébivolol. Ils sont présentés dans la figure 58 sous forme de marquage du cytosquelette d'actine (vert) et du noyau (rouge) ; les paramètres d'orientation et d'élongation cellulaire ont été évalués comme précédemment et les différentes comparaisons effectuées sont présentées comme suit :

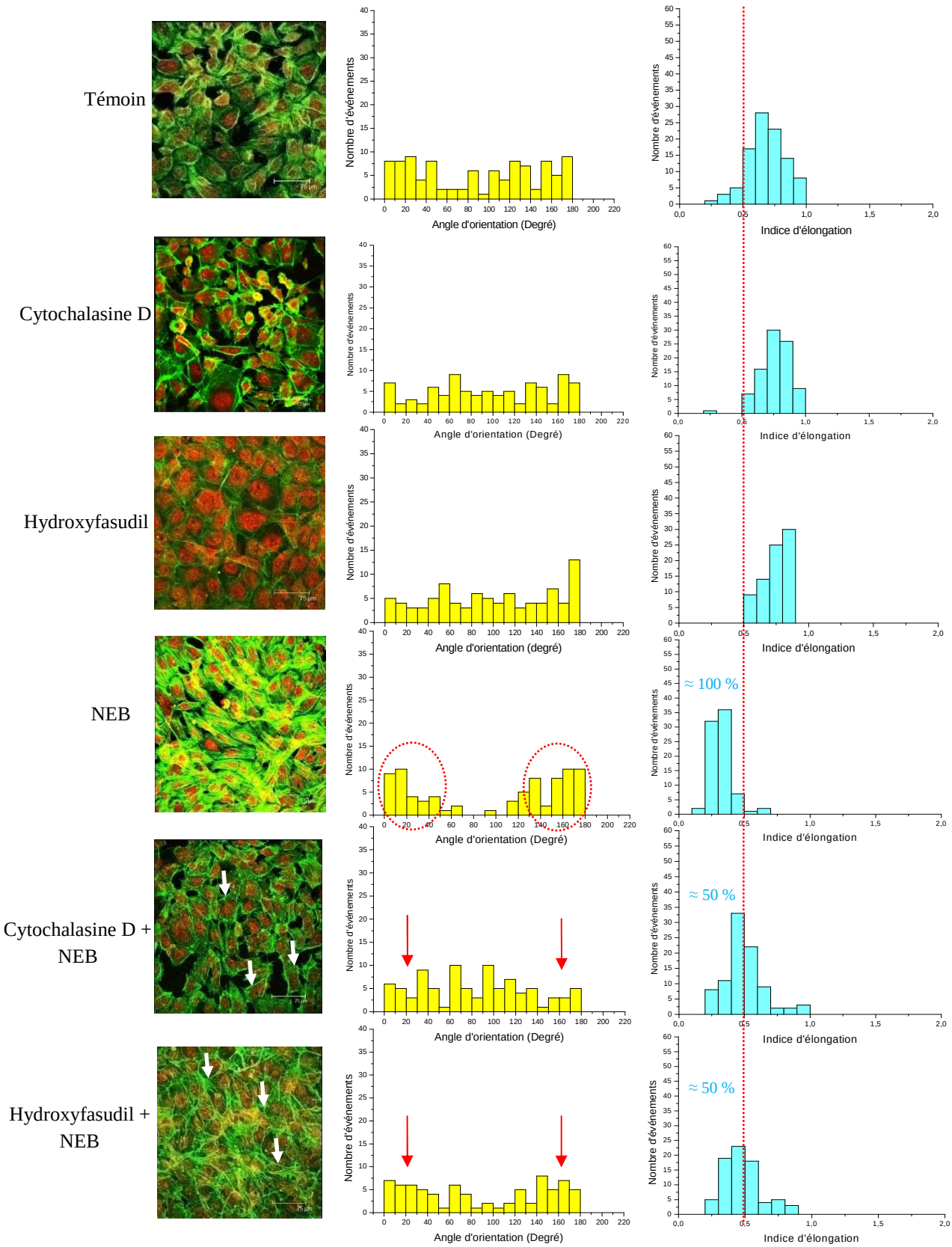
Cytochalasine D ou hydroxyfasudil par rapport au témoin

Nous observons que les cellules traitées avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil seuls, ne présentent aucun changement quant à leur orientation ou leur élongation par rapport au témoin, les populations cellulaires dans les trois conditions ayant un indice d'élongation compris entre 0,5 et 1 et présentant une distribution homogène sur le cytogramme d'orientation.

Cytochalasine D et hydroxyfasudil en présence de Nébivolol par rapport au Nébivolol seul

Comme il a été précédemment mentionné, le Nébivolol entraîne une orientation cellulaire (cercles en pointillés) avec une élongation de la quasi-totalité de la population cellulaire. Nous pouvons observer l'altération de cette réponse suite à la perturbation du cytosquelette avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil. En effet, les cellules perdent leurs orientation (flèches rouges) et le pourcentage d'élongation se voit réduit de moitié par rapport aux cellules traitées avec le Nébivolol seul. L'absence d'élongation et d'orientation est le

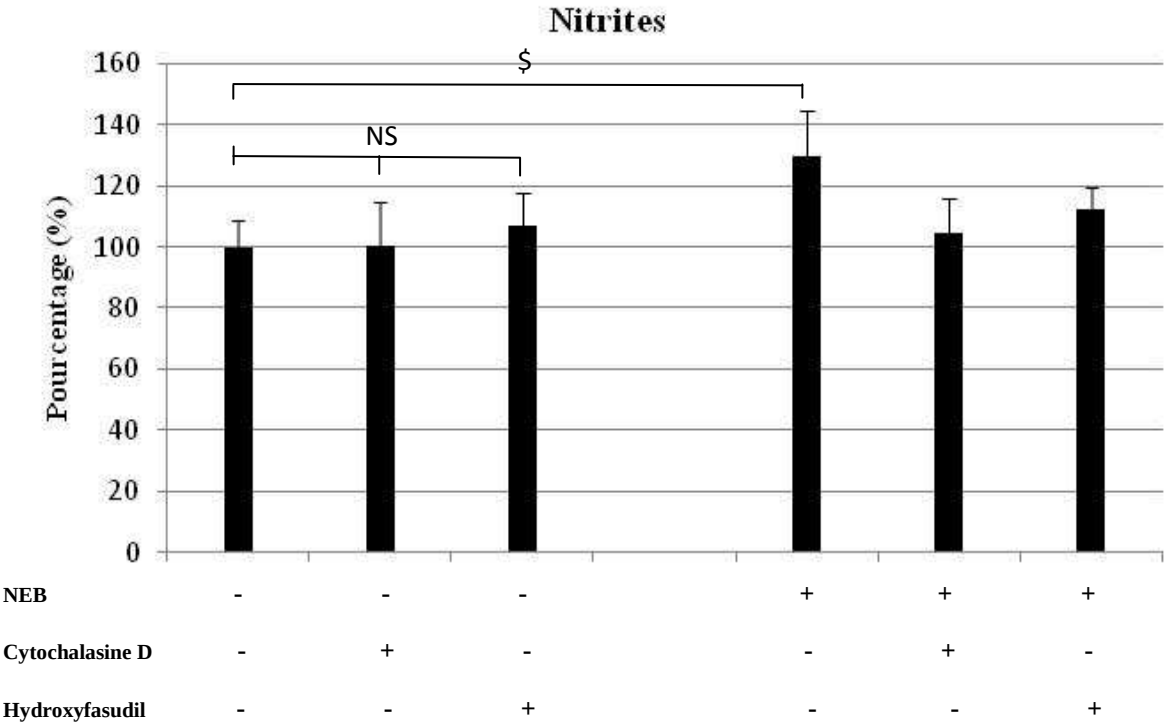
reflet de la diminution de la formation des fibres de stress ; d'ailleurs les images de microscopie montrent bien cette différence dans l'expression des fibres de stress entre les cellules traitées avec le Nébivolol seul ou en présence de cytochalasine D ou d'hydroxyfasudil (figure 58). Notons toutefois que l'actine corticale semble parfaitement conservée avec les deux molécules (cytochalasine D/hydroxyfasudil) en présence de Nébivolol (flèches blanches).



<u>Figure 58 :</u> effet de la perturbation du cytosquelette d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil sur le remodelage du cytosquelette d'actine des CE en présence ou non de Nébivolol. Le marquage immunofluorescent du cytosquelette avec la phalloïdine Alexa® 488 a permis d'étudier les angles d'orientation ainsi que les indices d'élongation des cellules, (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

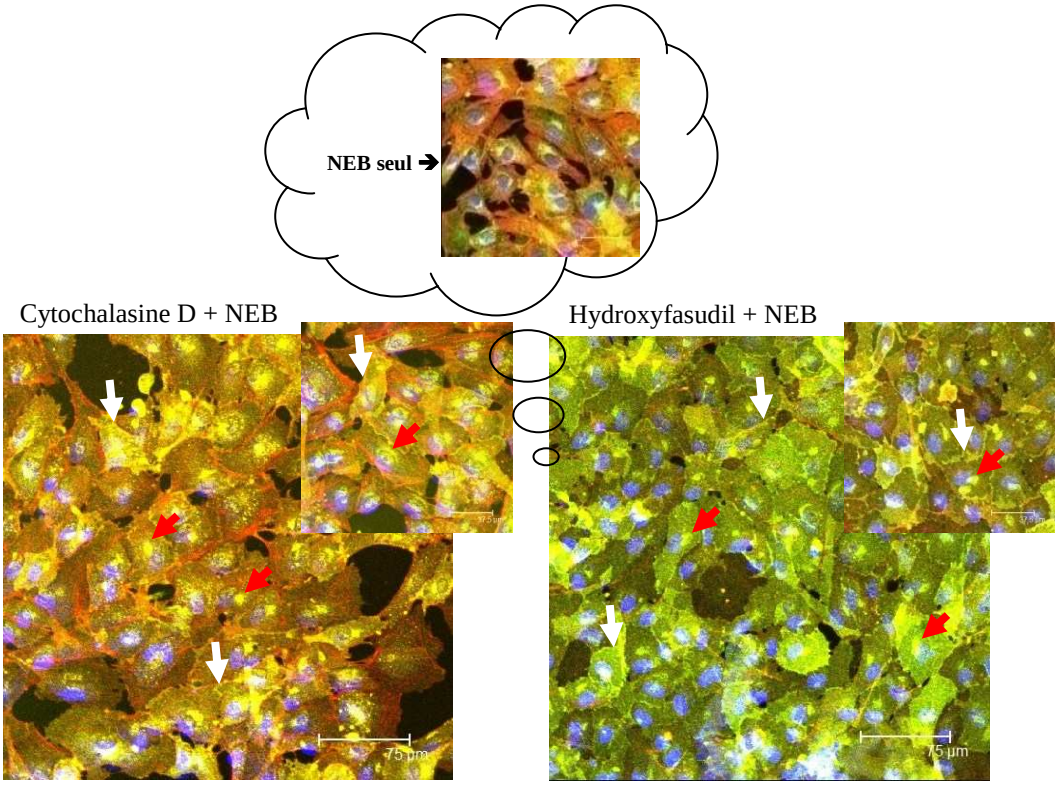
La figure 59 présente les résultats de la production des nitrites dans nos différentes conditions. Aucune différence n'est détectée en présence de cytochalasine D ou d'hydroxyfasudil par rapport au témoin négatif (=100%). Ceci indique, tout comme nous l'avons constaté (cf. figure 56), que la production de NO est probablement inhibée à la suite de sa forte production pendant les trois premières heures.

En présence de Nébivolol, une faible diminution des nitrites est détectée sous l'action de la cytochalasine D ou d'hydroxyfasudil par rapport au Nébivolol seul. Le phénomène que nous cherchons à mettre en évidence est que, malgré la perturbation des filaments d'actine, il y a eu diminution de la production de NO en présence de Nébivolol. Dans le cas contraire, on aurait obtenu un taux élevé de nitrites après 24h de culture (similaire à celui trouvé à 30min et 1h).



<u>Figure 59 :</u> effet de la perturbation du cytosquelette d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil sur la production des nitrites induite par le Nébivolol chez des CE après 24h d'incubation. Dosage à l'aide du réactif de *Griess* (R&D système, France). Les résultats sont exprimés en pourcentage de production par rapport au témoin négatif (= 100%). La perturbation du cytosquelette abaisse le taux de nitrites après 24h d'incubation en présence de Nébivolol par rapport au Nébivolol seul. ($p< 0,05 versus témoin, N = 6).

Par ailleurs, la localisation intracellulaire de la eNOS, en présence de l'une ou l'autre des molécules perturbatrices du cytosquelette en présence de Nébivolol, révèle que l'enzyme est partagée entre les deux compartiments cellulaires. Sur la figure 60 les flèches blanches désignent la eNOS péri-membranaire et les flèches rouges la eNOS péri-nucléaire. Ces résultats indiquent que la translocation de la eNOS dans le compartiment péri-membranaire, dans le cas où la cellule ne peut pas exprimer les fibres de stress, constitue un mécanisme supplémentaire à l'inhibition de l'activité de la eNOS à la suite d'une production élevée de NO : et ce à la seule condition que l'actine corticale soit épargnée.



<u>Figure 60 :</u> localisation intracellulaire de la eNOS après 24h d'incubation des CE avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil en présence de Nébivolol. En vert apparaît la eNOS, en rouge le cytosquelette d'actine marqué à la phalloïdine Alexa® 594, et en bleu apparaissent les noyaux marqués au Hoechst. Les images montrent que la eNOS est partagée entre les compartiments péri-membranaire (flèches blanches) et péri-nucléaire (flèches rouges) dans les deux conditions de culture (Microscopie confocale à balayage laser, objectif 40x, immersion eau ; ON 0,80, Leica Allemagne). (N = 9).

Conclusion 8

A l'issue de ces expériences, nous concluons que l'inhibition de la eNOS dans la cellule à la suite d'une forte production de NO peut être liée à l'un des deux mécanismes :

- Soit l'augmentation de la formation de fibres de stress ayant pour rôle de piéger la eNOS dans les fractions membranaires via la formation des complexes actine-cavéoline-eNOS, comme nous l'avons observé à partir de 3h de culture avec le Nébivolol,

- Soit la translocation péri-membranaire de l'enzyme, comme nous l'avons constaté dans le cas de l'inhibition de la formation des fibres de stress, que ce soit en présence ou en l'absence de Nébivolol.

A l'issue de nos expériences, nous avons rassemblé dans le tableau 6 l'ensemble de nos résultats, en mettant en évidence les traitements appliqués aux cellules avec les différentes concentrations des molécules utilisées (Nébivolol, inhibiteurs,…), et enfin les conclusions qui en découlent.

Tableau 6 : résumé des résultats obtenus.

Echantillon	Traitements	Dose	Temps	Réponse	Déductions possibles
HUVEC	Cisaillement	1,2 Pa 1,2 Pa 2 Pa 2 Pa	6h 24h 6h 24h	Orientation (40%) + élongation (40%), nitrites + Orientation (65%) + élongation (54%) nitrites + + Orientation (70%)+ élongation (54%) nitrites + + Orientation (76%)+ élongation (95%), **nitrites = témoin**	L'orientation, l'élongation cellulaires et la production des nitrites sont dépendants de l'amplitude et du temps d'exposition à la contrainte La production de NO semble dépendre de la structure du cytosquelette d'actine
	Nébivolol	10, 50, 100, 150, 200, …, 500 µM	24h	Nitrites + à partir de 200µM	
	Nébivolol	200µM	24h	Nitrites + Translocation péri-nucléaire de la eNOS Orientation +élongation de 95% des cellules Augmentation de l'expression des fibres de stress	
	Nébivolol + Cisaillement	200µM 2 Pa	24h	Nitrites +++ Translocation péri-nucléaire de la eNOS Modification de l'orientation cellulaire normalement induite par le cisaillement Augmentation de l'expression des fibres de stress	Le Nébivolol aurait une action précoce sur la structure du cytosquelette d'actine
	Nébivolol	200µM	30 min, 1, 3, 5, 15, 24h	30 min, 1h ➔ dépolymérisation des filaments d'actine + augmentation de l'expression de la eNOSp et de la production des nitrites 3h, 5h ➔ repolymérisation des filaments d'actine, diminution de l'expression de la eNOSp accompagnée d'une diminution de la production des nitrites 5h – 24h ➔ expression plus importante des fibres de stress par rapport au témoin avec une production de nitrites stable entre 3 et 24h	Le Nébivolol augmente la production des nitrites par les CE pendant la première heure d'incubation par un mécanisme dépendant du cytosquelette d'actine. En dépolymérisant les filaments d'actine, le Nébivolol entraîne la libération et donc la translocation de la eNOS du compartiment péri-membranaire au compartiment péri-nucléaire, la phosphorylation de l'enzyme sur le site Ser^{1177} lui permet d'être active et de produire NO

Echantillon	Traitements	Dose	Temps	Réponse	Déductions possibles
HUVEC	**Contrôle** SNP (donneur de NO)	150µM	30 min, 1, 3, 5, 15 et 24h	30 min ➔ aucun effet sur la structure du cytosquelette d'actine 1h – 24h ➔ augmentation de l'expression des fibres de stress par rapport au témoin	L'effet du donneur de NO sur le cytosquelette d'actine est différent de celui du Nébivolol pendant la première heure d'incubation, mais semble similaire au-delà. ➔ nous pouvons suggérer que : **1-** la dépolymérisation des filaments d'actine pendant la première heure de culture avec le Nébivolol est bien due à ce dernier. **2-** l'augmentation de l'expression des fibres de stress au-delà d'1h pourrait être entraînée suite à la forte production de NO pendant la première heure. Nous avons pensé que le but serait d'inhiber la eNOS, ce qui pourrait expliquer la diminution de la phosphorylation de celle-ci accompagnée par la diminution de la production des nitrites.
	Implication de la eNOS et la Akt Nébivolol + LNAME (Inhibiteur de eNOS) + I-Akt (inhibiteur des Akt)	300µM 5µM	3h et 24h	Diminution de la production des nitrites avec les inhibiteurs seuls ou combinés au Nébivolol	Le mode d'action du Nébivolol implique entièrement la eNOS sans faire intervenir la iNOS. L'activation de la eNOS, selon nos résultats, semble dépendre de la Akt
	Expression de la iNOS Nébivolol **Témoin positif** ➔ + TNFα	200µM 10 et 20µM	24h	Le Nébivolol, contrairement au TNFα, n'induit pas l'expression de la iNOS dans les CE	

Echantillon	Traitements	Dose	Temps	Réponse	Déductions possibles
HUVEC	**Implication des récepteurs adrénergiques β3**				
	Nébivolol + SR 59230A (antagoniste des récepteurs β3)	200µM 100 et 200µM	30 min et 1h	L'antagoniste seul ou combiné au Nébivolol ne semble avoir aucun effet sur la production des nitrites	L'action du Nébivolol n'implique pas les récepteurs adrénergiques β3
	Effet du Nébivolol sur l'activité de la eNOS suite à la perturbation du cytosquelette d'actine				
	Cytochalasine D Hydroxyfasudil (inhibiteur de la Rho-kinase)	20nM 20µM	30 min, 1, 3, 5, 15 et 24h	1h, 3h ➔ augmentation importante de la production des nitrites 5h – 24 h ➔ diminution de la production des nitrites **A 24h** ➔ dépolymérisation des filaments d'actine ➔ localisation péri-membranaire (actine corticale) de la eNOS	La diminution de la production des nitrites a lieu même lorsque les filaments d'actine sont endommagés.
	+ Nébivolol	200µM	24h	Altération de l'effet du Nébivolol sur l'élongation cellulaire Maintien de la diminution de la production des nitrites malgré la perturbation des filaments d'actine La localisation de la eNOS est partagée entre les deux compartiments péri-membranaire et péri-nucléaire	L'inhibition de la eNOS dans les CE à la suite d'une forte production de NO semble impliquer deux mécanismes : ➔ soit l'augmentation de la formation des fibres de stress qui fixe la eNOS et forme des complexes avec la F-actine ➔ soit la translocation péri-membranaire de la eNOS à condition que l'actine corticale soit épargnée

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

La majorité des travaux sur le mode d'action du Nébivolol se sont concentrés sur l'implication de la eNOS ainsi que sur les récepteurs adrénergiques β. L'influence du Nébivolol sur la structure des filaments d'actine du cytosquelette n'a encore jamais été évaluée. Puisque ces derniers jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de la eNOS, ils pourraient interagir avec le Nébivolol pour augmenter la production de NO.

Dans notre étude, nous avons établi, en étudiant la relation : cytosquelette d'actine/activité de la eNOS (localisation et phosphorylation), qu'il existait une relation entre l'effet du Nébivolol sur l'augmentation de la production de NO, et les changements structuraux qu'il apporte au cytosquelette d'actine.

Nos résultats ont mis en évidence l'implication du cytosquelette d'actine dans la production des nitrites sous contraintes de cisaillement en l'absence de Nébivolol. La production des nitrites semble diminuer suite à l'augmentation de l'expression des fibres de stress induite par la contrainte mécanique.

Dans les conditions statiques, le Nébivolol induit une élongation cellulaire, alors que dans les conditions dynamiques, il modifie la cinétique d'orientation des cellules, qui, normalement, sont parallèles au sens du cisaillement après 24h d'exposition. Dans les deux conditions de culture, le Nébivolol augmente la production des nitrites, avec cependant une valeur plus élevée sous cisaillement. Cette production est accompagnée d'une translocation péri-nucléaire de la eNOS et d'une augmentation dans l'expression des fibres de stress. Nous avons constaté que ces résultats présentaient des contradictions avec la littérature, en effet :

1- L'augmentation de la production des nitrites apparaît contradictoire avec l'expression des fibres de stress.

2- L'expression des fibres de stress est contradictoire avec la localisation péri-nucléaire de la eNOS.

Au vu de ces résultats, l'idée d'un effet précoce du Nébivolol sur le cytosquelette d'actine est apparue :

Comme le résume la figure 61, nous avons montré que le Nébivolol induit une dépolymérisation des filaments au cours de la première heure de culture. Cette réponse est accompagnée par une production importante de nitrites, une translocation péri-nucléaire et une phosphorylation de la eNOS sur le site Ser^{1177}. Au-delà de cette période, nous avons pu observer une importante repolymérisation de l'actine accompagnée par une déphosphorylation de la eNOS et une diminution dans la production des nitrites.

Une étude plus approfondie du rôle de la eNOS dans cette voie a révélé que son inhibition ou l'inhibition de la Akt altère la production des nitrites après 30 min et 24h d'incubation en présence de Nébivolol. Parallèlement à cela, les résultats du western blotting montrent que l'inhibition de la Akt atténue fortement la phosphorylation de la eNOS en présence de Nébivolol après 30 min de culture.

Pour vérifier que l'effet observé sur les filaments d'actine est bien dû au Nébivolol et non au NO produit par ce dernier, nous avons évalué l'effet d'un donneur de NO, le Nitroprussiate de sodium (SNP), sur la structure des filaments au cours du temps. Les résultats révèlent que le profil que suit la formation des filaments en réponse au SNP est différent de celui obtenu en réponse au Nébivolol pendant la période d'activité de ce dernier, plus précisément à 30 min et 1h. En revanche, les deux molécules entraînent une augmentation dans l'expression des fibres de stress au-delà d'1 heure.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'envisager que :

1- La dépolymérisation des filaments d'actine pendant la première heure de culture est due à la présence de Nébivolol. Cette dépolymérisatiuon entraîne la libération et la translocation de la eNOS du compartiment péri-membranaire vers le compartiment péri-nucléaire. Ceci induit la phosphorylation de l'enzyme telle que le montrent les résultats d'immunofluorescence et de western blotting, entraînant au final l'augmentation de la production des nitrites. La production des nitrites en réponse au Nébivolol pendant cette période est aussi exclusivement dépendante de l'activation de la eNOS et de la Akt. Cette dernière s'avère, selon nos résultats, être la principale kinase responsable de la phosphorylation de l'enzyme à la suite de sa libération et à sa translocation péri-nucléaire.

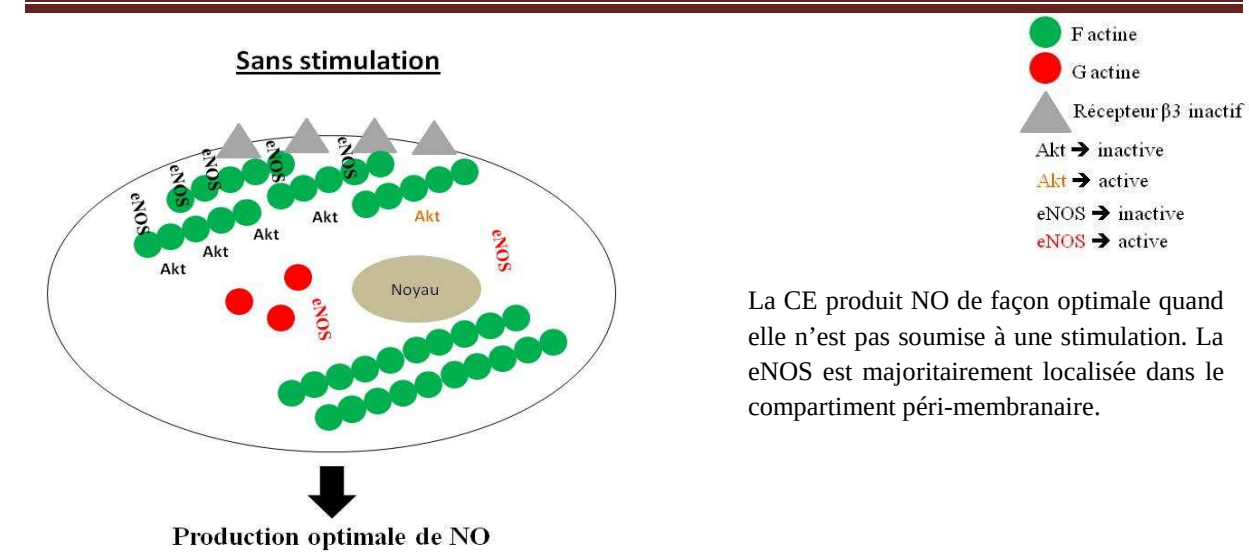
2- L'augmentation de l'expression des fibres de stress au delà d'une heure de culture avec le Nébivolol pourrait, en effet, être consécutive à la production élevée de NO à 30 min et 1h. En nous appuyant sur les résultats de la littérature, il semble probable que ces fibres soient

à l'origine de la diminution de la production de NO au-delà d'1h de culture en présence de Nébivolol.

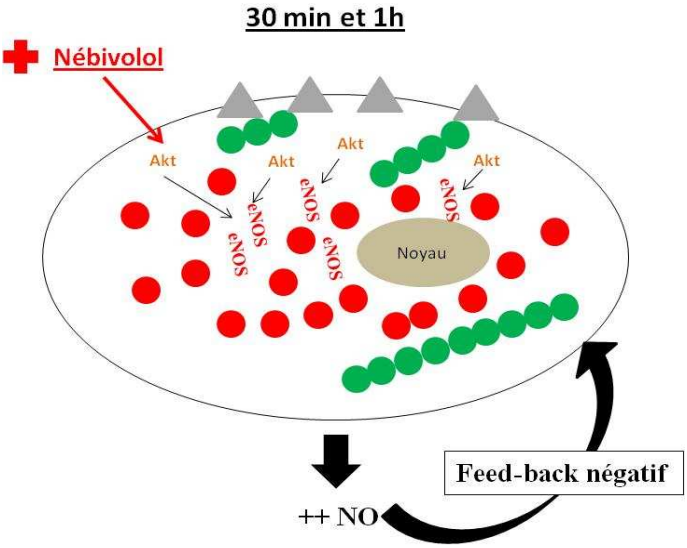
Une étude visant l'implication des récepteurs β3 par le Nébivolol dans l'augmentation de la production de NO, a révélé que l'utilisation d'un antagoniste spécifique de ces récepteurs n'altère pas la production des nitrites induite par le Nébivolol après 30 min et 1h de culture. Ce résultat indiquerait que ces récepteurs ne sont pas impliqués dans la voie de signalisation activée par le principe actif.

Enfin, un mécanisme autre que la formation des fibres de stress semble être impliqué dans l'inhibition de la eNOS à la suite d'une importante production de NO. La perturbation des filaments d'actine avec la cytochalasine D ou l'hydroxyfasudil en présence de Nébivolol, donne, après 24h, le même résultat en termes de production de nitrites que le Nébivolol seul. Ce résultat surprenant s'explique si l'on considère la localisation intracellulaire de la eNOS qui transloque dans le compartiment péri-membranaire quand les cellules sont incapables d'exprimer les fibres de stress. Ainsi, l'inhibition de la eNOS dans la cellule, à la suite d'une forte production de NO, peut « recruter » l'un des deux mécanismes suivants : soit une augmentation de la formation de fibres de stress ayant pour rôle de « piéger » la eNOS dans les fractions membranaires via la formation des complexes actine-cavéoline-eNOS, soit la translocation péri-membranaire de l'enzyme.

Cette étude nous a permis de proposer une nouvelle voie d'action d'une molécule hypotensive, qui s'avère dépendante des filaments d'actine du cytosquelette. Cependant, la signalisation cellulaire étant d'une grande complexité, il existe certainement d'autres voies à explorer et dont l'éventuelle implication serait complémentaire au mode d'action que nous avons proposé.

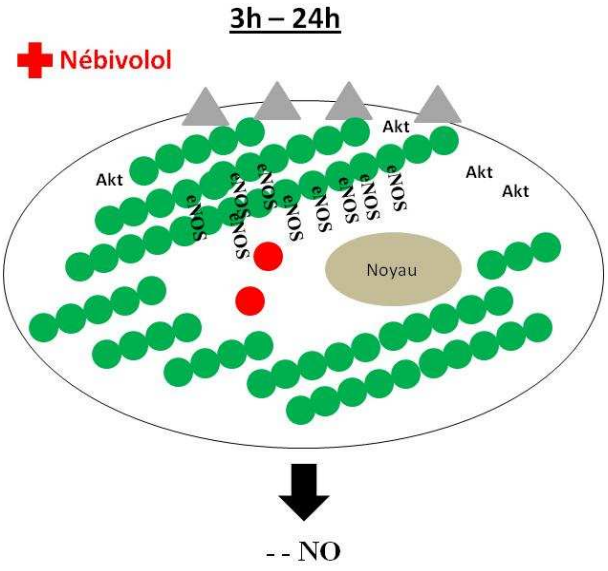


La CE produit NO de façon optimale quand elle n'est pas soumise à une stimulation. La eNOS est majoritairement localisée dans le compartiment péri-membranaire.



Après 30 min et 1h de culture en présence de Nébivolol, on observe une dépolymérisation des filaments d'actine. Il en résulte une translocation et une phosphorylation de la eNOS sur le site Ser[1177]. Cette phosphorylation est possible grâce aux Akt qui s'activent en présence du Nébivolol, une activation qui, selon nos résultats, semble indépendante des récepteurs β3.

De tous ces événements, résulte une augmentation dans la production de NO, qui serait donc exclusivement dépendante de la eNOS et la Akt, et indépendante de la iNOS.



Selon les résultats obtenus avec le premier contrôle (SNP), une production élevée de NO peut déclencher un feed-back négatif qui consiste en une augmentation de l'expression des fibres de stress dans le but de « piéger » la eNOS dans ces structures et par conséquent l'inhiber. C'est ce que nous observons avec le Nébivolol au-delà d'1h de culture. L'augmentation de l'expression des fibres de stress s'accompagne d'une déphosphorylation de la eNOS qui conserve cependant une localisation péri-membranaire mais probablement liée aux fractions membranaires ou aux fibres de stress. Une diminution de la production des nitrites est notée en même temps que la déphosphorylation de la eNOS et la formation des fibres de stress.

Figure 61 : schéma résumé du mode d'action du Nébivolol sur les CE.

Perspectives

Nos résultats indiquent que le Nébivolol stimule la production de NO par les EC grâce à un mécanisme dépendant des filaments d'actine du cytosquelette. La plus grande partie de notre étude s'est déroulée dans des conditions statiques. Il serait souhaitable de pouvoir valider ces résultats sur des CE ou des anneaux d'artères soumis au préalable à des contraintes de cisaillement ou éventuellement prélevées sur des animaux hypertendus traités ou non avec le Nébivolol.

L'effet du Nébivolol sur le cytosquelette d'actine pourrait être davantage approfondi en présence cette fois d'un agent stabilisant des filaments d'actine, tel que la phalloïdine. L'étude consisterait dans le traitement des cellules avec cette molécule avant l'ajout du Nébivolol et la mesure de son effet sur la production des nitrites et la localisation et la phosphorylation de la eNOS.

Par ailleurs, la réponse cellulaire observée à la suite de l'inhibition de la Rho-kinase, reste en partie mal expliquée. Rappelons que la Rho-kinase est connue :

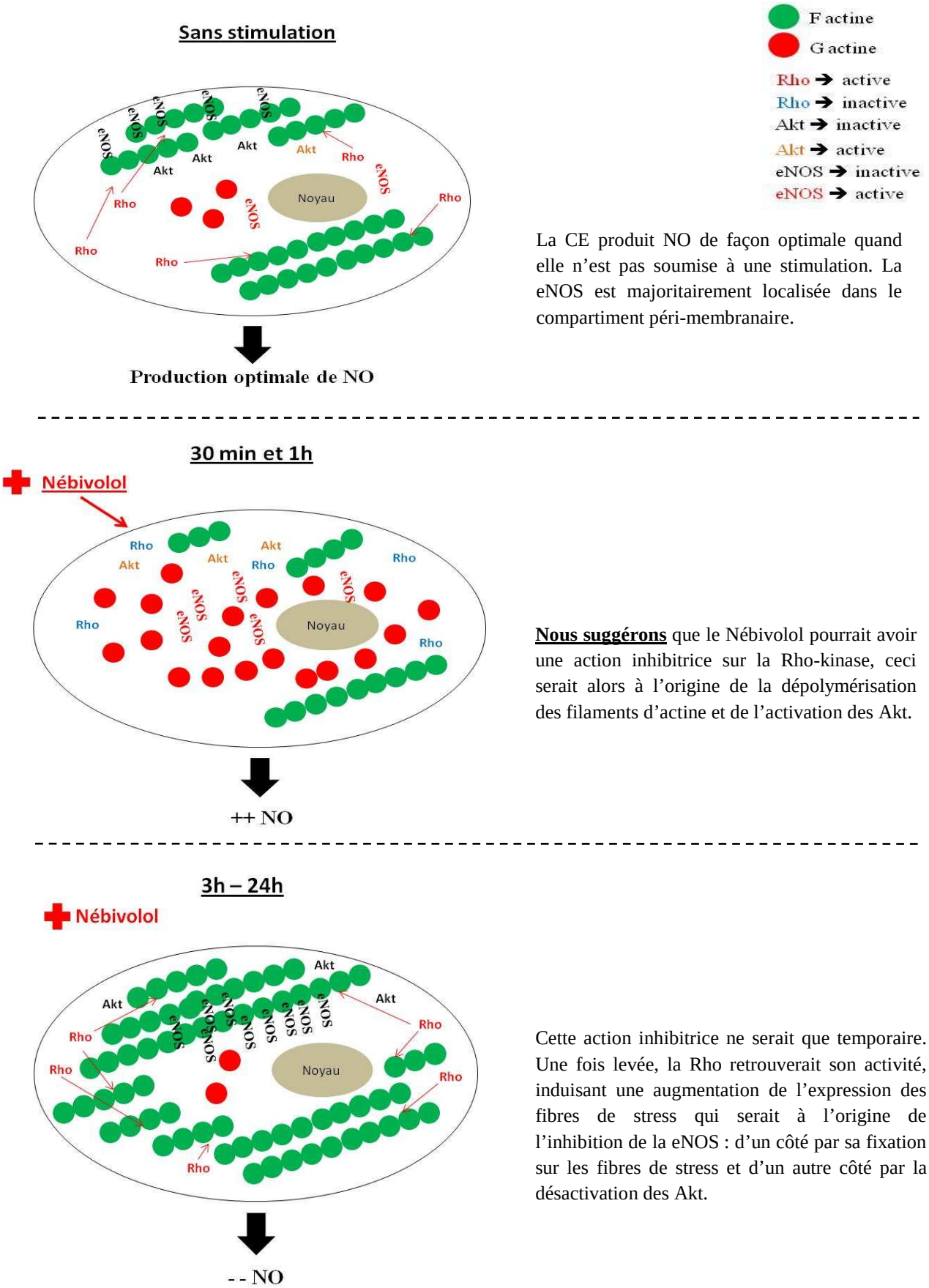
1- Pour son rôle dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine et de la formation des fibres de stress : son inhibition entraîne la perturbation des filaments,

2- Pour son rôle inhibiteur de la eNOS : la Rho, active, phosphoryle la eNOS sur le site Thr^{495}, l'enzyme étant ainsi sous une forme inactive. En revanche, son inhibition entraîne la phosphorylation des Akt et donc de la eNOS.

La démonstration par Dessy et al., (2005) que le Nébivolol entraîne une déphosphorylation de la eNOS sur le site Thr^{495} nous a incité à imaginer une nouvelle voie du mode d'action du Nébivolol, qui pourrait expliquer l'effet observé sur le cytosquelette d'actine tout au long de la période de culture (figure 62) ; c'est-à-dire de la dépolymérisation dès la première heure jusqu'à l'augmentation de la formation des fibres de stress au-delà de 3h. Le Nébivolol se révélerait alors un inhibiteur **temporaire** de la Rho-kinase, responsable de la dépolymérisation des filaments d'actine pendant la première heure d'incubation en même temps que la phosphorylation de la eNOS. Une fois l'effet inhibiteur levé, la Rho retrouverait alors son activité, formerait les fibres de stress et inhiberait la eNOS à la suite de la déphosphorylation des Akt.

Pour vérifier cela, il faudrait employer des techniques plus appropriées de biologie moléculaire. On pourrait à titre d'exemple utiliser des cellules transfectées exprimant un mutant positif de la Rho-kinase et étudier par la suite si le Nébivolol a toujours une action identique.

D'autres voies d'approches sont sans doute à découvrir et comme on peut le voir, le Nébivolol, dont l'action chez l'hypertendu est avérée, peut et doit agir ou interagir avec des mécanismes cellulaires complexes dont la finalité est la vasorelaxation. La CE, cellule utilisée dans nos expériences, interagit avec le Nébivolol mais il ne faut pas oublier les autres cellules de la paroi vasculaire, en particulier les CML avec lesquelles le Nébivolol pourrait aussi réagir. Quelques études sont rapportées, mais une étude de l'impact du Nébivolol sur une co-culture CE/CML permettrait peut-être d'approfondir la compréhension de son mode d'action.



La CE produit NO de façon optimale quand elle n'est pas soumise à une stimulation. La eNOS est majoritairement localisée dans le compartiment péri-membranaire.

Nous suggérons que le Nébivolol pourrait avoir une action inhibitrice sur la Rho-kinase, ceci serait alors à l'origine de la dépolymérisation des filaments d'actine et de l'activation des Akt.

Cette action inhibitrice ne serait que temporaire. Une fois levée, la Rho retrouverait son activité, induisant une augmentation de l'expression des fibres de stress qui serait à l'origine de l'inhibition de la eNOS : d'un côté par sa fixation sur les fibres de stress et d'un autre côté par la désactivation des Akt.

Figure 62 : schéma illustrant une hypothèse sur le rôle potentiel de la Rho-kinase dans le mode d'action du Nébivolol.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abu-Soud HM, Ichimori K, Presta A, Stuehr DJ. Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 2000;275:17349-17357.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 2001;357:593-615.

Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:10909-10913.

Antoine PY. Guide pratique de cardiologie. Paris : Le Généraliste : Gazette médicale, 1993.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. Pharmacol Rev. 1998;50:197-263.

Arch JR, Kaumann AJ. Beta 3 and atypical beta-adrenoceptors. Med Res Rev. 1993;13:663-729.

Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. Circ Res. 1996;78:750-758.

Blin N, Camoin L, Maigret B, Strosberg AD. Structural and conformational features determining selective signal transduction in the beta 3-adrenergic receptor. Mol Pharmacol. 1993;44:1094-1104.

Boo YC, Sorescu G, Boyd N, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. J Biol Chem. 2002;277:3388-3396.

Boura C. Intérêts des films multicouches de polyélectrolytes utilisés comme modification de surface dans la conception de substitues vasculaires. Thèse ; 2003. Université Henri Poincaré-Nancy 1, école doctorale biologie-santé-environnement.

Broeders MA, Doevendans PA, Bekkers BC, et al. Nebivolol: a third-generation beta-blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial beta(2)-adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. Circulation. 2000;102:677-684.

Brune B, Mohr S, Messmer UK. Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1996;127:1-30.

Bussemaker E, Pistrosch F, Forster S, et al. Rho kinase contributes to basal vascular tone in humans: role of endothelium-derived nitric oxide. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293:H541-547.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood. 1994;84:2068-2101.

Chappey O, Wautier MP, Wautier .JL. Structure et function de l'endothélium. 1997. La revue du Praticien (Paris) : 2223-6.

Charara J. Effet de l'écoulement sur le devenir des cellules endothéliales : dispositif d'étude, revue et commentaires. RBM.1993. 15,8 : 435-445.

Chlopicki S, Kozlovski VI, Gryglewski RJ. N0-dependent vasodilation induced by nebivolol in coronary circulation is not mediated by beta-adrenoceptors or by 5 HT1A-receptors. J Physiol Pharmacol. 2002;53:615-624.

Cicha I, Goppelt-Struebe M, Muehlich S, et al. Pharmacological inhibition of RhoA signaling prevents connective tissue growth factor induction in endothelial cells exposed to non-uniform shear stress. Atherosclerosis. 2008;196:136-145.

Cohen JD. Overview of physiology, vascular biology, and mechanisms of hypertension. J Manag Care Pharm. 2007;13:S6-8.

Conrad PA, Smart EJ, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. J Cell Biol. 1995;131:1421-1433.

Das SK, Mukherjee S, Banerjee DK. Beta-adrenoreceptors of multiple affinities in a clonal capillary endothelial cell line and its functional implication. Mol Cell Biochem. 1994;140:49-54.

de Groot AA, Mathy MJ, van Zwieten PA, Peters SL. Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. J Cardiovasc Pharmacol. 2003;42:232-236.

De Ponti F, Gibelli G, Croci T, Arcidiaco M, Crema F, Manara L. Functional evidence of atypical beta 3-adrenoceptors in the human colon using the beta 3-selective adrenoceptor antagonist, SR 59230A. Br J Pharmacol. 1996;117:1374-1376.

Dessy C, Saliez J, Ghisdal P, et al. Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. Circulation. 2005;112:1198-1205.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. 1999;399:601-605.

Eckert R, Randall DJ, Burggren WW, French K. Physiologie animale, mécanismes et adaptations. Paris ; Bruxelles , De Boeck Université , 1999

Emorine L, Blin N, Strosberg AD. The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. Trends Pharmacol Sci. 1994;15:3-7.

Eto M, Barandier C, Rathgeb L, et al. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. Circ Res. 2001;89:583-590.

Evangelista S, Garbin U, Pasini AF, Stranieri C, Boccioletti V, Cominacini L. Effect of DL-nebivolol, its enantiomers and metabolites on the intracellular production of superoxide and nitric oxide in human endothelial cells. Pharmacol Res. 2007;55:303-309.

Fam SR, Gallagher CJ, Salter MW. P2Y(1) purinoceptor-mediated Ca(2+) signaling and Ca(2+) wave propagation in dorsal spinal cord astrocytes. J Neurosci. 2000;20:2800-2808.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. J Clin Invest. 1999;103:897-905.

Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. Acta Physiol Scand. 2000;168:81-88.

Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca2+-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. Circ Res. 1998;82:686-695.

Fleming I, Bauersachs J, Schafer A, Scholz D, Aldershvile J, Busse R. Isometric contraction induces the Ca2+-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:1123-1128.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003;284:R1-12.

Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. Cardiovasc Res. 1999;43:532-541.

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

Fontana J, Fulton D, Chen Y, et al. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. Circ Res. 2002;90:866-873.

Fujimoto T, Miyawaki A, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. J Cell Sci. 1995;108 (Pt 1):7-15.

Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. Trends Pharmacol Sci. 2001;22:32-39.

Fulton D, Fontana J, Sowa G, et al. Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. J Biol Chem. 2002;277:4277-4284.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 1999;399:597-601.

Gao WD, Liu Y, Marban E. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. Circulation. 1996;94:2597-2604.

Garban HJ, Buga GM, Ignarro LJ. Estrogen receptor-mediated vascular responsiveness to nebivolol: a novel endothelium-related mechanism of therapeutic vasorelaxation. J Cardiovasc Pharmacol. 2004;43:638-644.

Gaucher C. Relation CE/substitue sanguins : Implication des contraintes de cisaillement ou de l’hypoxie, et évaluation de la cytotoxicité d’hémoglobine de nouvelle génération. Thèse ; 2007. Université Henri Poincaré-Nancy 1, école doctorale biologie-santé-environnement.

Gauthier C, Seze-Goismier C, Rozec B. Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. Clin Hemorheol Microcirc. 2007;37:193-204.

Gebhardt T, Gerhard R, Bedoui S, et al. beta2-Adrenoceptor-mediated suppression of human intestinal mast cell functions is caused by disruption of filamentous actin dynamics. Eur J Immunol. 2005;35:1124-1132.

Georgescu A, Pluteanu F, Flonta ML, Badila E, Dorobantu M, Popov D. The cellular mechanisms involved in the vasodilator effect of nebivolol on the renal artery. Eur J Pharmacol. 2005;508:159-166.

Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:2788-2793.

Gosgnach W, Boixel C, Nevo N, Poiraud T, Michel JB. Nebivolol induces calcium-independent signaling in endothelial cells by a possible beta-adrenergic pathway. J Cardiovasc Pharmacol. 2001;38:191-199.

Gosink EC, Forsberg EJ. Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca2+ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. Am J Physiol. 1993;265:C1620-1629.

Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Renal Physiol. 2001;280:F193-206.

Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. Lancet. 1994;344:859-861.

Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. J Intern Med. 2006;259:351-363.

Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. Circulation. 1996;93:1087-1094.

Ignarro LJ, Sisodia M, Trinh K, et al. Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. Nitric Oxide. 2002;7:83-90.

Imbrogno S, Angelone T, Adamo C, Pulera E, Tota B, Cerra MC. Beta3-adrenoceptor in the eel (Anguilla anguilla) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. J Exp Biol. 2006;209:4966-4973.

Isenberg JS, Tabatabai N, Spinelli HM. Nitric oxide modulation of low-density mononuclear cell transendothelial migration. Microsurgery. 2005;25:452-456.

Janssen PM, Zeitz O, Rahman A, Hasenfuss G. Protective role of nebivolol in hydroxyl radical induced injury. J Cardiovasc Pharmacol. 2001;38 Suppl 3:S17-23.

Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. Circ Res. 2003;93:354-363.

Jin ZG, Wong C, Wu J, Berk BC. Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. J Biol Chem. 2005;280:12305-12309.

Jourd'heuil D, Morise Z, Conner EM, Grisham MB. Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation. J Clin Gastroenterol. 1997;25 Suppl 1:S61-72.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. J Biol Chem. 1997;272:18522-18525.

Kadi A, de Isla N, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P. Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells (Effect of rate and time of exposure). Clin Hemorheol Microcirc. 2007;37:131-140.

Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, et al. Effects of vasodilatory beta-adrenoceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney. Hypertension. 1999;33:467-471.

Kalinowski L, Dobrucki LW, Szczepanska-Konkel M, et al. Third-generation beta-blockers stimulate nitric oxide release from endothelial cells through ATP efflux: a novel mechanism for antihypertensive action. Circulation. 2003;107:2747-2752.

Kamp O, Sieswerda GT, Visser CA. Comparison of effects on systolic and diastolic left ventricular function of nebivolol versus atenolol in patients with uncomplicated essential hypertension. Am J Cardiol. 2003;92:344-348.

Kaumann AJ, Molenaar P. Differences between the third cardiac beta-adrenoceptor and the colonic beta 3-adrenoceptor in the rat. Br J Pharmacol. 1996;118:2085-2098.

Kelm M, Feelisch M, Krebber T, Motz W, Strauer BE. Mechanisms of histamine-induced coronary vasodilatation: H1-receptor-mediated release of endothelium-derived nitric oxide. J Vasc Res. 1993;30:132-138.

Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science. 1996;273:245-248.

Klinger JR. The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension. Clin Chest Med. 2007;28:143-167, ix.

Knudsen HL, Frangos JA. Role of cytoskeleton in shear stress-induced endothelial nitric oxide production. Am J Physiol. 1997;273:H347-355.

Kondrikov D, Han HR, Block ER, Su Y. Growth and density-dependent regulation of NO synthase by the actin cytoskeleton in pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006;290:L41-50.

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

Kook H, Ahn KY, Lee SE, Na HS, Kim KK. Nitric oxide-dependent cytoskeletal changes and inhibition of endothelial cell migration contribute to the suppression of angiogenesis by RAD50 gene transfer. FEBS Lett. 2003;553:56-62.

Korenaga R, Ando J, Tsuboi H, et al. Laminar flow stimulates ATP- and shear stress-dependent nitric oxide production in cultured bovine endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 1994;198:213-219.

Krstic MK, Stepanovic R, Ilic K, Krstic SK. Endothelium-independent contractile and relaxant responses to histamine in the rabbit aorta and common carotid, mesenteric, renal, and femoral arteries. Gen Pharmacol. 1996;27:529-533.

Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, et al. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. J Cell Biol. 1992;118:1003-1014.

Ladage D, Brixius K, Hoyer H, et al. Mechanisms underlying nebivolol-induced endothelial nitric oxide synthase activation in human umbilical vein endothelial cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33:720-724.

Laufs U, Endres M, Stagliano N, et al. Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. J Clin Invest. 2000;106:15-24.

Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. J Biol Chem. 1998;273:24266-24271.

Lee SL, Fanburg BL. Beta adrenergic antagonists inhibit serotonin uptake by pulmonary vascular cells in culture. J Pharmacol Exp Ther. 1991;257:895-900.

Legrand Y. Le sang et les vaiseaux. 1987. Hermann, France. pp3-29.

Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. J Intern Med. 2006;259:381-392.

Lehoux S, Tedgui A. Shear and signal transduction in the endothelial cell. Med Sci (Paris). 2004;20:551-556.

Lei W. Modification de l'expression et de la phosphorylation de la VASP dans les cellules endothéliales soumises aux écoulements. Thèse ; 2004. Université Henri Poincaré-Nancy 1, école doctorale biologie-santé-environnement.

Lekakis JP, Protogerou A, Papamichael C, et al. Effect of nebivolol and atenolol on brachial artery flow-mediated vasodilation in patients with coronary artery disease. Cardiovasc Drugs Ther. 2005;19:277-281.

Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. Nitric Oxide. 2002;7:132-147.

Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase expression by ovine fetoplacental artery endothelial cells. Biol Reprod. 2003;69:1053-1059.

Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. Endothelium. 2005;12:21-39.

Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. Biol Reprod. 2004;70:785-796.

Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. J Biomech. 2005;38:1949-1971.

Liggett SB. Functional properties of the rat and human beta 3-adrenergic receptors: differential agonist activation of recombinant receptors in Chinese hamster ovary cells. Mol Pharmacol. 1992;42:634-637.

Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. Trends Cell Biol. 1994;4:231-235.

Ma XL, Lopez BL, Christopher TA, Birenbaum DS, Vinten-Johansen J. Exogenous NO inhibits basal NO release from vascular endothelium in vitro and in vivo. Am J Physiol. 1996;271:H2045-2051.

Maffei A, Di Pardo A, Carangi R, et al. Nebivolol induces nitric oxide release in the heart through inducible nitric oxide synthase activation. Hypertension. 2007;50:652-656.

Manara L, Badone D, Baroni M, et al. Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta 3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. Br J Pharmacol. 1996;117:435-442.

Marrero MB, Venema VJ, Ju H, et al. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. Biochem J. 1999;343 Pt 2:335-340.

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? J Clin Invest. 1997;100:2146-2152.

Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem. 2001;276:17625-17628.

Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. Curr Biol. 1999;9:845-848.

Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. Mol Cell Biol. 2002;22:8467-8477.

Molenaar P, Sarsero D, Kaumann AJ. Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the putative beta 4-adrenoceptor' in mammalian heart. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1997;24:647-656.

Muller S, Sun R, Legrand S, Labrador V, Wang X, Stoltz JF. Influence of laminar shear stress on cytosqueleton and ICAM-1 expression of endothelial cells. Appl Mech Engineering. 1999;4:151-6.

Muller S, Dumas D, Bensoussan D, Sun RJ, Wei L, Yang J, Stoltz JF. From hemorheology to vascular mechanobiology. Clin Hemorheol and Microcircul. 2004;30:185-200.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell. 1995;81:53-62.

Noris M, Morigi M, Donadelli R, et al. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. Circ Res. 1995;76:536-543.

Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. Am J Physiol Renal Physiol. 2004;287:F274-280.

Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, Fukai N, Yoshimoto T, Hirata Y. Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. Hypertens Res. 2004;27:93-99.

Parenti A, Filippi S, Amerini S, Granger HJ, Fazzini A, Ledda F. Inositol phosphate metabolism and nitric-oxide synthase activity in endothelial cells are involved in the vasorelaxant activity of nebivolol. J Pharmacol Exp Ther. 2000;292:698-703.

Parinandi NL, Sharma A, Eubank TD, et al. Nitroaspirin (NCX-4016), an NO donor, is antiangiogenic through induction of loss of redox-dependent viability and cytoskeletal reorganization in endothelial cells. Antioxid Redox Signal. 2007;9:1837-1849.

Patel V, Brown C, Boarder MR. Protein kinase C isoforms in bovine aortic endothelial cells: role in regulation of P2Y- and P2U-purinoceptor-stimulated prostacyclin release. Br J Pharmacol. 1996;118:123-130.

Pott C, Steinritz D, Bolck B, et al. eNOS translocation but not eNOS phosphorylation is dependent on intracellular Ca2+ in human atrial myocardium. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;290:C1437-1445.

Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 1998;273:27383-27388.

Pritchard KA, Jr., Ackerman AW, Gross ER, et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 2001;276:17621-17624.

Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. Circ Res. 2005;97:1232-1235.

Rikitake Y, Liao JK. Rho-kinase mediates hyperglycemia-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular endothelial cells. Circulation. 2005;111:3261-3268.

Robinson LJ, Busconi L, Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1995;270:995-998.

Rouget C, Breuiller-Fouche M, Mercier FJ, et al. The human near-term myometrial beta 3-adrenoceptor but not the beta 2-adrenoceptor is resistant to desensitisation after sustained agonist stimulation. Br J Pharmacol. 2004;141:831-841.

Rozec B, Gauthier C. beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. Pharmacol Ther. 2006;111:652-673.

Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. Faseb J. 1993;7:308-316.

Rushmer R, Frazer. Dynamique de l’appareil cardio-vasculaire. Paris , Doin ; Philadelphia : Saunders , 1979.

Sanchez FA, Savalia NB, Duran RG, Lal BK, Boric MP, Duran WN. Functional significance of differential eNOS translocation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291:H1058-1064.

Schilling K, Opitz N, Wiesenthal A, et al. Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. Mol Biol Cell. 2006;17:3870-3880.

Schroder H. Antihypertensive therapy with left cardiac insufficiency. Med Monatsschr Pharm. 2005;28:443-444.

Seasholtz TM, Brown JH. Rho Signaling in vascular diseases. Mol Interv. 2004;4:348-357.

Selemidis S, Dusting GJ, Peshavariya H, Kemp-Harper BK, Drummond GR. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. Cardiovasc Res. 2007;75:349-358.

Shalev M, Staerman F, Allain H, Lobel B, Saiag B. Stimulation of P2y purinoceptors induces, via nitric oxide production, endothelium-dependent relaxation of human isolated corpus cavernosum. J Urol. 1999;161:955-959.

Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location. Annu Rev Physiol. 2002;64:749-774.

Sheehy AM, Burson MA, Black SM. Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide. Am J Physiol. 1998;274:L833-841.

Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. J Biol Chem. 1999;274:33057-33063.

Silva G, Beierwaltes WH, Garvin JL. Extracellular ATP stimulates NO production in rat thick ascending limb. Hypertension. 2006;47:563-567.

Sirotiakova J, Mlyncek M, Kriska M, Letkovicova M. Acebutolol in the treatment of arterial hypertension in pregnancy--comparison with commonly used hypertensive agents. Ceska Gynekol. 2002;67:8-15.

Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol Cell Biol. 1999;19:7289-7304.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell. 1994;76:301-314.

Stoltz J.F, Boisseau M, Muller S, Wang X, Legrand S, Labrador M.V. Hémorhéologie et cellules endothéliales vasculaires. J. Mal. Vascul. 1999, 24 : 99-109. « 1 ».

Stoltz JF, Muller S, Wang X, Dumas D, Boisseau M, Legrand S, Labrador V. Hemorheology and vascular endothelial cells. Clin Hemorheol and Microcircul. 1999;20:127-39. « 2 ».

Stoltz JF, Singh M, Riha P, Labrador V, Sun R, Traore M, Zhao H, Yang J, Muller S, Wang X. Hemorheology : A survey. Actas Bioq 2003;6:33-48.

Stoltz JF, Muller S, Kadi A, Sun R, Decot V, Menu P, Bensoussan D. Endothelial cell biology and influence of mechanical parameters. Clin Hemorheol and Microcircul. 2007;37:5-8.

Strosberg AD, Pietri-Rouxel F. Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor. Trends Pharmacol Sci. 1996;17:373-381.

Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR, Block ER. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. Am J Physiol Cell Physiol. 2003;284:C1542-1549.

Su Y, Kondrikov D, Block ER. Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase. Cell Biochem Biophys. 2005;43:439-449.

Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007;361:462-467.

Sun RJ, Muller S, Stoltz JF, Wang X. Shear stress induces Caveolin-1 translocation in cultured endothelial cells. European Biophysical Journal. 2002;30:605-11.

Sun RJ, Muller S, Wang X, Zhuang FY, Stoltz JF. Regulation of von Willebrand factor of human endothelial cells exposed to laminar flows : an in vitro study. Clin Hemorheol and microcircul. 2000;23:1-11.

Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2002;106:57-62.

Tao J, Yang Z, Wang JM, Tu C, Pan SR. Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells. Cardiology. 2006;106:82-88.

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. Faseb J. 1995;9:866-873.

Tiruppathi C, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Ca2+ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. Microcirculation. 2006;13:693-708.

Toshima J, Toshima JY, Amano T, Yang N, Narumiya S, Mizuno K. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. Mol Biol Cell. 2001;12:1131-1145.

Toumaniantz G, Seze C, Serpillon S, et al. Vascular beta-adrenergic remodeling in rat transgenic model over-expressing endothelial beta3-adrenoceptors. Arch Mal Coeur Vaiss. 2005;98:836-840.

Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. Circulation. 2001;104:511-514.

Tzima E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. Circ Res. 2006;98:176-185.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. Am J Physiol. 1995;269:C1371-1378.

Ungvari Z, Sun D, Huang A, Kaley G, Koller A. Role of endothelial [Ca2+]i in activation of eNOS in pressurized arterioles by agonists and wall shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281:H606-612.

van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. J Anat. 2002;200:549-560.

van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. J Anat. 2002;200:549-560.

Volovyk ZM, Wolf MJ, Prasad SV, Rockman HA. Agonist-stimulated beta-adrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover. J Biol Chem. 2006;281:9773-9780.

Wedgwood S, Bekker JM, Black SM. Shear stress regulation of endothelial NOS in fetal pulmonary arterial endothelial cells involves PKC. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;281:L490-498.

Wedgwood S, Mitchell CJ, Fineman JR, Black SM. Developmental differences in the shear stress-induced expression of endothelial NO synthase: changing role of AP-1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003;284:L650-662.

Wehling M. Pharmacology of beta blockers and their significance for therapy of hypertension. Herz. 2002;27 Suppl 1:16-25.

Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, et al. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1842-1847.

Wood KS, Buga GM, Byrns RE, Ignarro LJ. Vascular smooth muscle-derived relaxing factor (MDRF) and its close similarity to nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun. 1990;170:80-88.

Yoshioka T, Iwamoto N, Tsukahara F, Irie K, Urakawa I, Muraki T. Anti-NO action of carvedilol in cell-free system and in vascular endothelial cells. Br J Pharmacol. 2000;129:1530-1535.

Yu DY, Su EN, Cringle SJ, Alder VA, Yu PK, Desantis L. Effect of betaxolol, timolol and nimodipine on human and pig retinal arterioles. Exp Eye Res. 1998;67:73-81.

Zeitz O, Rahman A, Hasenfuss G, Janssen PM. Impact of beta-adrenoceptor antagonists on myofilament calcium sensitivity of rabbit and human myocardium. J Cardiovasc Pharmacol. 2000;36:126-131.

Zharikov SI, Block ER. Association of L-arginine transporters with fodrin: implications for hypoxic inhibition of arginine uptake. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000;278:L111-117.

Zharikov SI, Sigova AA, Chen S, Bubb MR, Block ER. Cytoskeletal regulation of the L-arginine/NO pathway in pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;280:L465-473.

Zhu Y, Liao HL, Niu XL, et al. Low density lipoprotein induces eNOS translocation to membrane caveolae: the role of RhoA activation and stress fiber formation. Biochim Biophys Acta. 2003;1635:117-126.

(http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio902)

(http://www.chups.jussieu.fr)

(http://www.ulisse.u-bordeaux.fr)

(http://w3med.univ-lille2.Fr)

(http://www.drug.com)

(http://www.sigmaaldrich.com

(http://www.merckbiosciences.co.uk)

(http://www.merckbiosciences.co.uk

(http://www.merckbiosciences.co.uk)

(http://www.sigmaaldrich.com)

(http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_nitroprusside)

Publications

Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells

[Effect of rate and time of exposure]

Kadi A[1], de Isla N[1], Lacolley P[2], Stoltz J.F[1], Menu P[1]

(1) Groupe de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA-UMR CNRS 7563, Faculté de Médecine, 9 av. de Haye (Nancy Université-UHP), 54505 Vandoeuvre, France.

(2) Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire, UMR INSERM-UHP 684, Faculté de Médecine, 9 av. de Haye (Nancy Université-UHP), 54505 Vandoeuvre, France.

Correspondence to:

KADI Assia

Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Faculté de Médecine, Bat E

9, avenue de la forêt de Haye

54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

France

Tél: 33. (0).83.68.34.74

Fax: 33. (0).83.68.34.59

e-mail: assia.kadi@medecine.uhp-nancy.fr

Abstract:

Endothelial cells (ECs) which participate the interface between the blood and the vessel wall undergo morphologic changes in response to shear stress induced by blood flow, liable for the important regulation on physiologic and pathophysiologic function of blood vessels. Shear stress induced changes in cell morphology, begin with elongation in the direction of shearing and end by a reorientation and assembly of F-actin stress fibers. Shear stress is also implicated in many important ECs functions such as: decrease of platelet aggregation, anti-thrombogenic and anti-adhesive effects, inhibition of vascular smooth muscle cell (SMC) proliferation and regulation of their contraction and arterial tonicity, via a regulation of vasodilator and vasoconstrictor secretion molecules such as nitric oxide (NO), endothelin I, prostacyclin and angiotensin II. Besides, many of human diseases such as hypercholesterolemia, diabetes and hypertension, are strongly linked to a disturbance of the production of several vasodilator or vasoconstrictor molecules.

The aim of this *in-vitro* study was to evaluate the potential balance between time and rate effects of shearing in cell shape changes and e-NOS activity. Two unidirectional steady laminar flow rates (1.2 Pa and 2.0 Pa) were applied on EC monolayers, each one for a short and a long period, (6h and 24h). Cytoskeleton organization was evaluated by actin filaments labelling and observed by confocal microscopy. NO production was evaluated by a colorimetric method using the Griess reagent kit for nitrite determination.

Results showed that laminar flow affected cell rearrangement by inducing cytoskeleton reorientation and increased production of NO. Laminar shear rate at 2.0 Pa for 24h did not upregulate NO release. Whereas at 1.2 Pa for 24h, NO release increased by 33% compared with the static conditions. Both 1.2 Pa and 2.0 Pa for 6h increased NO release by 17% and 24% respectively as compared with the static conditions. These observations suggested that

stress fiber assembly, which controls EC reorientation and NO production, are dependent on rate and time of shearing. In addition, there appear to be a relation between the cytoskeleton reorganization stage and NO production. These results could promote the parameters to evaluate the more appropriate pattern of shearing, to evaluate a potential pharmacological effect on hypertension disorder decrease.

Keywords: e-NOS, Nitric oxide, ECs, SMCs, shear stress, hypertension, vasorelaxation, and cytoskeleton reorganization.

I- Introduction:

Blood vessels are permanently exposed to hemodynamic forces in the form of cyclic stretch and shear stress due to the pulsatil nature of blood pressure and flow. ECs and SMCs are exposed to both types of mechanical forces. Moreover, ECs act as a sensing surface to transduce hydrodynamic forces into intracellular signals that affect vascular development, structure and physiologic functions, at first through responses that it induces in the vascular endothelium. [1, 2]. The responses of the endothelium to shearing are various; especially shear regulates endothelial expression; endothelial release of vasoconstrictor/vasodilator molecules such as NO, prostacyclin, endothelin-1 (ET-1) and cyclooxygenase-derived contracting factors. A critical balance between these contracting and relaxing factors is crucial to maintain normal vascular smooth muscle tone and reactivity [3, 4]. Endothelium dysfunction, which is mainly characterized by an inability of the ECs to modulate vascular tone, has been frequently associated with hypertension. Experimental and clinical studies of hypertension have raised the possibility that a selective defect in NO synthesis is responsible for an impaired endothelium-dependent vasodilation [1]. Production of NO is dependent on e-NOS activity, which is classified as a constitutive and strictly Ca^{2+} /CaM-dependent enzyme. Indeed, in response to shearing, there is an increase in the intracellular concentration of free Ca^{2+}. Binding between Ca^{2+} and CaM is essential to activate the constitutive enzyme and enhances endothelial NO production using oxygen and L-arginine as a substract and releasing L-citrulline as a side product [5, 6, 7, 8, 9]. The endothelium of blood vessels uses nitric oxide to inducing smooth muscle relaxes, hence dilating the artery and increasing blood flow. NO has chemical properties of a small water and lipid soluble, diffusible, chemically reactive, and short-lived gas with a high binding affinity for iron and sulfur [10]. NO diffuses from ECs to SMCs through the cell membranes, and activates guanylate cyclase increasing intracellular

cyclic guanosine monophosphate (cGMP) which induces a signaling pathway mediated by kinase proteins and leading to SMC relaxation [9].

Shear stress also induces changes in endothelial cell morphology that are associated with modifications in the cell cytoskeleton organization and cell-adhesion proteins such as Von Willebrand factor (vWF). The vWF is constitutively secreted or stored in Weibel-palad bodies and released upon stimulation. Changes induced by shearing, modified the cells polarization, cell elongation in the direction of the shear vector, and coalignment of the microtubule and microfilament systems in this direction. These morphologic responses of ECs are important because they protect themselves from too high shearing and may thereby limit shear-induced trauma on the cells. In addition, the reorganization of cell-cell junctions, that occurs as the cells change shape, likely contributes to the enhanced transendothelial transport of proteins and low density lipoproteins. At last, adaptative responses of endothelium to shear stress undoubtedly influence the ongoing capacity of the cells to transduce mechanical forces, because virtually all of the putative shear sensors in these cells (focal adhesion, caveolae, cell-cell junctional complexes, and cytoskeleton) dramatically reorganize [11].

In this study, we investigated the potential relation between physical and biochemical parameters in sheared ECs. We investigated:

1) The effects of time and rate of shear stress on EC shape changes. The reorganization of the cytoskeleton was observed by confocal microscopy.

2) The impact of time and rate of shear stress on e-NOS activity via quantification of NO released in the culture medium. For that, ECs were sheared by two different shearing (1.2 Pa and 2.0 Pa), applied during two different periods (6h and 24h).

II- Materials and Methods:

II.1- Cell culture and seeding:

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from fresh umbilical cords according to the method of Jaffe et al. HUVEC were cultured at 37°C in 5% CO_2 in 25 cm^2 tissue culture-treated flask in complete medium. The medium consisted of an equal mixture of medium M199 and medium RPMI 1640, contained 20% human serum, 2mM L-glutamine, 20mM HEPES, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2,5 µg/mL fungison. Before each experiment glass slides were irradiated by UV for 10min and coated with 1mL of gelatine 1%. The cells were seeded at the second passage culture at 10.10^4 cells/cm^2 on glass slides for 48h of growing [12].

II.2- Shear stress exposure:

The cover glasses seeded with a ECs monolayer were assembled to a widely used flow chamber assembled by vacuum. A steady flow was generated by a peristaltic pump (Ismatec, Switzerland). Because of the large ratio width/height of the flow chamber, the flow was considered as a two-dimensional Poiseuille flow. Thus the shear stress (τ) was calculated with the following equation: $\tau = 6Q\mu/H^2w$ where Q is the volumetric flow rate, μ the dynamic viscosity of the medium, H the height (0.24 mm) and w the width (18 mm) of the flow chamber. Then, ECs were exposed to two different shear rates (1.2 Pa and 2.0 Pa) for two different times (6h and 24h). Shearing experiments were carried out at 37°C in 5% CO_2. For the static control, cells were kept in the same tissue culture conditions but without shearing [12].

II.3- Cytoskeleton immunostaining:

ECs were sheared by a steady laminar shear stress of 1.2 and 2.0 Pa for 6 and 24h each; cytoskeleton rearrangement was mesured by immunostaining and observed by confocal microscopy. Experiments were performed in triplicate with an internal duplicate.

- Labelling protocol:

Following shear stress, ECs were washed one time with RPMI -1640 W/O phenol red (SIGMA) and were incubated for 10 min in a solution of Paraformaldehyd 1% at 37°C then washed with RPMI -1640 W/O phenol red. Cells were permeabilized with a solution of Triton X100 0.5% and washed three times with RPMI-1640 W/O phenol red supplemented with 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin). ECs were incubated for 45 min at 37°C with 200µL of 1/100 dilution Alexa fluor® 488 phalloidin (Molecular probes) in a solution of Triton X100 0.5%. Subsequently, ECs were washed twice with 500 µL of RPMI-1640 W/O phenol red to remove excess phalloidin. ECs were then incubated for 30 min at 37°C with 200 µL of 1/1000 dilution propidium Iodide (Molecular probes) in RPMI-1640 W/O phenol red for nuclear visualisation after which excess of the fluorescent molecule was removed by ECs being washed twice with 500 µL of RPMI-1640 W/O phenol red. Finaly, intensity of fluorescence was observed by confocal microscopy [12] (Confocal microscopy: Leica, objective 60X, water immersion, NA 0.80, Germany).

II.4- Nitric oxide quantification

Because NO has an extremely short half-life, it makes difficult to detect and mesure directly. However, as NO is metabolized to nitrite and nitrate, quantitation of these stable anions can be used to determine indirectly the amount of NO release by cells. After shearing or static

conditions, media were collected and nitrite concentration was measured using the Griess diazotization reaction by spectrophotomety. The detection limit for this method is 1µM [13].

ECs were sheared by 1.2 and 2.0 Pa each one for 6 and 24h. For nitrite level, equal volumes of N-(1-naphtyl) ethylenediamine (Component A) and sulfanilic acid (Component B) were mixed together to form the Griess reagent (Molecular Probes). In the microplate, are mixed together: 20µL of griess reagent, 130µM of deionized water and 150µL of the shearing medium. A photometric reference sample was prepared by mixing 20µL of Griess reagent and 280µL of deionized water and a calibration curve was determined by diluting a nitrite standard solution (Component C) with deionized water. Finaly mixtures were incubated for 30 min at room temperature and the absorbance of the nitric-containing samples was measured at 570 nm.

II.5- Statistical analysis:

The results were expressed as a mean ± SD for each experiment (n = 3). One-factor ANOVA with PLSD Fisher correction (Statview IV®, Abacus Concepts Inc, USA) was used to analyse the data. A p value of <0.05 was taken as significant.

III- Results:

III.1- Shear stress induced cytoskeleton rearrangement:

To determine whether rate and time of exposure of ECs to shear influenced cytoskeleton rearrangement and whether flow induced cytoskeleton reorganization was related to e-NOS activity, just confluent ECs monolayer were exposed to two rates of shearing (1.2 Pa and 2.0 Pa) in a parallel flow chamber during short and long periods (6h and 24h). Control cells were kept for the same time under static conditions. ECs were then fixed and actin filaments reorientation was observed by confocal microscopy after labeling. Non sheared ECs showed a round shape with less prominent stress fiber and a junctional dense peripheral band of F-actin was established (Figure.1, Ia, IIa). After shearing, we observed a reorganization of the cytoskeleton with alignment of cells and stress fibers (Figure.1, I bc, II bc). However, the cytoskeleton rearrangement and cell alignment were not the same in all the cases, there were differences according to the amplitude and the time of shearing. We observed reorganization of actin filaments and cell elongation with 1.2 Pa for 6h, but with random orientation (Figure.1, Ib). When the amplitude of shearing was increased to 2.0 Pa cells were elongated and had the same orientation which was oblique compared to the flow direction (Figure.1, Ic). More prolonged shearing (24h) resulted in better reorientation and elongation of ECs according to flow direction, showing on increase stress fiber formation at both 1.2 Pa and 2.0 Pa. It should be noted that, after shearing at 1.2 Pa for 6h and 24h and at 2.0 Pa for 6h, cells became separated from each other, thus creating gaps between them. However, at 2.0 Pa for 24h, cells adopted a more fusiform morphology with long axes parallel to the flow direction and cell regrouping implying fewer gaps between the cells (Figure.1, IIc).

III.2- Shear stress influenced NO production:

After shearing experiments, media were recovered for nitrite quantification. As shown in (figure. 2), application of shear in a rate and time-dependent fashion resulted in a significantly increase in the levels of nitrite production, when gradually increasing the shear rate from low to high levels and from short to long times. For 2.0 Pa/24h, there was no difference in nitrite production between sheared ECs and those maintained in static conditions. The nitrite production induced by shear rate increased respectively nearly 17%, 24% and 33% as compared to static conditions, for 1.2 Pa/6h, 2.0 Pa/6h and 1.2 Pa/24h, but there was no increase for 2.0 Pa/24h. In addition, it was noted that cells in static conditions maintained to produce nitrite, because there was an increase of 50% in nitrite production between cells kept for 6h and those kept for 24h (figure. 3). According to these results, we noticed that nitrite production was dependent of the time of the exposure, and also dependent of the shear rate, because cells subjected to shear stress for 6h produced more nitrite when they were sheared by 2.0 Pa than by 1.2 Pa.

IV- Discussion- Conclusion:

The results of the present study provide evidence showing that cytoskeleton remodeling responses of ECs are depending on the time course and the rate of fluid flow. The more important cytoskeleton rearrangement and cell alignment were obtained at 2.0 Pa for 24h compared to 2.0 Pa/6h, 1.2 Pa/6h or 1.2 Pa/24h. Previous studies have already investigated cytoskeleton reorganization in ECs subjected to shear stress [15, 16, 17], but a little have report it to NO production. In this study we try to correlate the cytoskeleton rearrangement and the NO production. That suggested, cells stop or reduce NO production following the complete reorganization of cell monolayer (at 2.0Pa/24h). Whereas, there is an increase in NO

production at 2.0 Pa/6h, 1.2 Pa/6h and 1.2 Pa/24h compared with their static controls, so it seems that there exists a relation between NO production and cytoskeleton rearrangement.

Studies that have investigated shear-dependent endothelial morphology in cell culture, report elongation of the cells and their orientation with the shear vector. However, there are striking differences in the time course of this response in different preparations. In our measurements, application of 1.2 Pa of shearing on just confluence ECs monolayer during 6h, revealed obviously an actin cytoskeleton rearrangement but cells are randomly orientated. Nevertheless, cells became better oriented after 24h of exposure. Increase the shear rate from 1.2 Pa to 2.0 Pa induced an oblique orientation of the majority of cells as compare to flow direction at 6h. However, after more prolonged shearing (24h), cells modulated their orientation and became parallel to the flow direction and closed the gaps created in the monolayer in the early stage of shearing. A similar delay in reorientation was observed by Obsorn et al [15] who reported that the alignment of Bovine aortic endothelial cells (BAECs) subjected to 1.2 Pa of shear rate in the direction of flow, required 24h of exposure, whereas in our experiments, alignment required 2.0 Pa of shear rate. At 1.2 Pa, we observed a reorganization of the cytoskeleton and some cells were already randomly oriented. We suggested that differences of cytoskeleton rearrangement and cell alignment observed in different experiments could be influenced by species of origin of cultured endothelium and passage number. We noted that BAECs were used at passage 2 to 10 and our ECs were used at 1st passage.

Galbraith et al [16] have reported that cells subjected to 1.5 Pa of shear rate did not monotonically elongate and align in the direction of fluid flow. It was shown that the change in structure and the alignment occurred in three distinct phases. In the first phase (0-3h), the nucleus of the cell shifted downstream with respect to the cell centroid, but the cell seemed to resist to the downstream movement by increasing its number of basal stress fibers and by

moving its adhesion sites toward the cell periphery. In the second phase (3-6h) the nucleus moved upstream to have a based location on one side of the cell, suggesting that cells could move in order to reorient within the monolayer. In the third and final stage (12-24h), the reoriented cells elongated in the direction of flow and close the gaps created in the monolayer by cell rearrangement exhibited in the previous phase. Birukov et al [17] have elucidated the effect of 1.0 Pa of shearing on rapid cytoskeletal reorganization (15 min) in pulmonary vascular endothelial cells. They observed that the cytoskeleton started reorganization with increased stress fiber formation in random orientation; when shear rate was prolonged to 24h, the cell reorientation in the direction of flow was observed. Some investigators have found that cellular actin redistributes and cells realign within 1 to 2h [18, 19], whereas others, including our laboratory, found that the processes need more time, going to 6h to 24h [11, 20]. In addition, Noria et al [21] were interested in the impact of confluence state of cultures on the time required for cells rearrangement. They reported that subconfluent or just confluent cells initiated reorganization of actin very quickly when shear stress was applied, whereas when cells were 2 days post confluent, only very modest shear-related F-actin reorganization occurred until 8h of shear at 1.5 Pa. In this case, it was observed that cell elongation and actin alignment with shear stress becames apparent after 8h and complete shape change cell after 24h of shearing [21].

Concerning our findings, we suggest that the oblique orientation at 2.0 Pa/6h is an early cells response to high shear rate, which seems to have for goal the reduction of intracellular stress. We estimate that these morphologic responses of ECs are important, because they diminish the extremes of shear apply on the cell monolayer, and prevented cells being removed from the substrate. According to the time of exposure, ECs are progressively orienting parallel to flow direction. It was reported that the movement of b-actin filaments is responsible for cell motility and shape changes [22]. In addition, stress fiber formation appears dependent on the

amplitude of the shear stress. Hence, complete shape changing, cells regrouping with filing of the gaps seen at 2.0 Pa/24h and not at 1.2 Pa/24h. This observation could complete our first suggestion concerning the cells origin and the passage number. We suggest that differences of cytoskeleton rearrangement and cell alignment may also include the state of confluence of the cultures.

As concern NO production after shearing, Noris et al [23] reported that the release required at least 6h of exposure of ECs to laminar shear rate. They suggested that NO upregulation after this interval could be taken as evidence that shear forces modulate the e-NOS gene. In addition, they demonstrated that both, fluid shear magnitude (0.8 and 1.2 Pa) and time of exposure (15 min and 6h), modulate NO synthesis, resulting in an increase of NO release proportional to the amplitude and with time of shearing. In our experiment conditions, we found that flow reorganized EC cytoskeletal proteins by rearranging the actin filament network into stress fibers, to be parallel to the flow direction. It could be proposed then that endothelial stress fibers may apply tension to resist the shear forces acting on the cells [16], allowing thus the cells to maintain their flattened phenotype and to remain firmly attached to the substratum. We suggest that the cytoskeleton could also provide a second signal for transducing the biomechanical stimulus sensed by the endothelial cell surface to the nucleus. This could favor transcriptional activation of e-NOS mRNA. That was demonstrated by Kondrikov et al [24], who studied the grown and density-dependent of e-NOS regulated by the actin cytoskeleton in pulmonary artery ECs. They demonstrated that e-NOS activity increased when cells were grown from preconfluence to confluence and this phenomenon was accompanied by an increase in NO production. They found also that there was a direct association of actin with e-NOS protein, and that the increase of e-NOS activity was dependent of this association. Actin density increased in confluent cells, responsible for the increase in e-NOS activity. Whereas, they found that e-NOS protein levels remained steady

after ECs reached 90% confluence. Schleider et al [25] suggested that the cytoskeleton plays a more decisive role in the regulation of e-NOS activity. They also demonstrated that e-NOS interacted directly with actin, and reported that e-NOS translocated to intercellular junctions in response to cell-cell contact formation, and this e-NOS translocation was accompanied by reduction in NO production. Our results showed that there is no difference in NO production by ECs when they are sheared by 2.0 Pa during 24h compared with the static control. We suggest that this downregulation of NO is due to total reorganization of the EC monolayer. Cells regrouping with filling of the gaps between them may create intracellular junctions, therefore e-NOS translocation and thus reduction of NO production.

In summary, we confirmed that cytoskeleton reorganization and cell alignment are dependent on rate and time of shearing. However, we showed that total reorganization of cell monolayer requires 24h of exposure to 2.0 Pa of shearing. In addition, production of NO by ECs is dependent both with shear rate condition and with the cytoskeleton reorganization. Total cytoskeleton reorganization and cells regrouping are accompanied by impairs in e-NOS activity and decreasing of NO production. Finely, these defined parameters are useful to study a pharmacological action on hypertension disorder reduction of ECs *in-vitro,* under conditions close to the physiological states. Thus, these conditions respect the ECs monolayer morphology in vessels.

References:

1- Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. J Biomech. **10** (2005), 1949-71.

2- Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. J Intern Med. **4** (2006), 381-92.

3- S Mélançon, F Bourgoin, M Badeau, M Pitre, H Bachelar. Aortic reactivity and endothelial function in young spontanously hypertensive rats fed a regular or a sucrose-enriched diet.

4- Isenberg JS, Tabatabai N, Spinelli HM. Nitric oxide modulation of low-density mononuclear cell transendothelial migration. Microsurgery. **5** (2005), 452-6.

5- Ingrid Fleming , Rudi Busse. Signal transduction of eNOS activation. Cardiovascular Research. **43** (1999), 532–541

6- J.B Michel. Rôle du monoxide d'azote endothelial dans la regulation du tonus artériel. La revue du praticien. 1997, 47.

7- Wu G, Meininger CJ. Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells. Am J Physiol. **6** (1993), H1965-71.

8- Keilhoff G, Reiser M, Stanarius A, Aoki E, Wolf G. Citrulline immunohistochemistry for demonstration of NOS activity in vivo and in vitro. Nitric Oxide. **4** (2000), 343-53.

9- Wendy K. ALDERTON*, Chris E. COOPER and Richard G. KNOWLES*1. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. Biochem. J. **357** (2001), 593±615

10- N Sennequier, S Vadon-Le Goff. Biosynthèse du monoxide d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. Médecine/sciences. **14** (1998), 1185-95

11- Guerci B, Kearney-Schwartz A, Bohme P, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. Diabetes Metab. **4** (2001), 425-34.

12- McCue S, Noria S, Langille BL. Shear-induced reorganization of endothelial cell cytoskeleton and adhesion complexes. Trends Cardiovasc Med. **4** (2004), 143-51.

13- Boura C, Muller S, Voegel JC, Schaaf P, Stoltz JF, Menu P. Influence of polyelectrolyte multilayer films on the ICAM-1 expression of endothelial cells. Cell Biochem Biophys. **2** (2006), 223-31.

14- Wessells H, Teal TH, Engel K, Sullivan CJ, Gallis B, Tran KB, Chitaley K. Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycaemia. BJU Int. **5** (2006), 1047-52.

15- Osborn EA, Rabodzey A, Dewey CF Jr, Hartwig JH. Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. Am J Physiol Cell Physiol. **2** (2006), C444-52.

16- Galbraith CG, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. Cell Motil Cytoskeleton. **4** (1998), 317-30.

17- Birukov KG, Birukova AA, Dudek SM, Verin AD, Crow MT, Zhan X, DePaola N, Garcia JG. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. **4** (2002), 453-64.

18- Tzima E, Del Pozo MA, Kiosses WB, Mohamed SA, Li S, Chien S, Schwartz MA. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. EMBO J. **24** (2002), 6791-800.

19- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K,Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. Science. **5651** (2003), 1704-9.

20- Imberti B, Morigi M, Zoja C, Angioletti S, Abbate M, Remuzzi A, Remuzzi G. Shear stress-induced cytoskeleton rearrangement mediates NF-kappaB-dependent endothelial expression of ICAM-1. Microvasc Res. **2** (2000), 182-8.

21- Noria S, Xu F, McCue S, Jones M, Gotlieb AI, Langille BL. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. Am J Pathol. **4** (2004), 1211-23.

22- Albuquerque ML, Flozak AS. Patterns of living beta-actin movement in wounded human coronary artery endothelial cells exposed to shear stress. Exp Cell Res. **2** (2001), 223-34

23- Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. Circ Res. **4** (1995), 536-43.

24- Kondrikov D, Han HR, Block ER, Su Y. Growth and density-dependent regulation of NO synthase by the actin cytoskeleton in pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **1** (2006), L41-50.

25- Schleicher M, Brundin F, Gross S, Muller-Esterl W, Oess S. Cell cycle-regulated inactivation of endothelial NO synthase through NOSIP-dependent targeting to the cytoskeleton. Mol Cell Biol. **18** (2005), 8251-8.

Figure legends:

Figure 1: Actin cytoskeleton remodelling and cell alignment in HUVEC cultures in response to shear rate. Confluent ECs were exposed to static conditions *(upper panel)*, or to 1,2 Pa *(middle panel)* or 2 Pa of shearing *(lower panel)*, for 6h *(left panel)* and 24h *(right panel)*. Both F-actin and nucleii were visualized using Alexa fluor® 488 phaloidin (Green fluorescence) and Propidium iodide (Red fluorescence) respectively. Intensity of fluorescence was observed by confocal microscopy (Confocal microscopy: Leica, objective 60X, water immersion, NA 0.80, Germany). Arrows show direction of flow. The results are representative of three independent experiments with an internal duplicate.

Figure 2: Graph shows the effect of laminar shear rate on nitric oxide (NO) release by HUVECs. Confluent HUVECs were incubated under static conditions *(white graphs)*, and laminar flow (1,2 Pa and 2 Pa) for (6h and 24h) *(black graphs)*. Supernatant was collected and nitrite level in the medium was measured using the Griess reagent kit. The results are representative of three independent experiments with an internal triplicate. Data are mean ± SD. * $p<.01$ versus static.

Figure 3: Graph shows the nitrite production in ECs in static conditions. Supernatant was collected after 6h and 24h and cumulative nitrite level was measured using the Griess reagent kit. Data are mean ± SD. * $p<.01$ versus 6h.

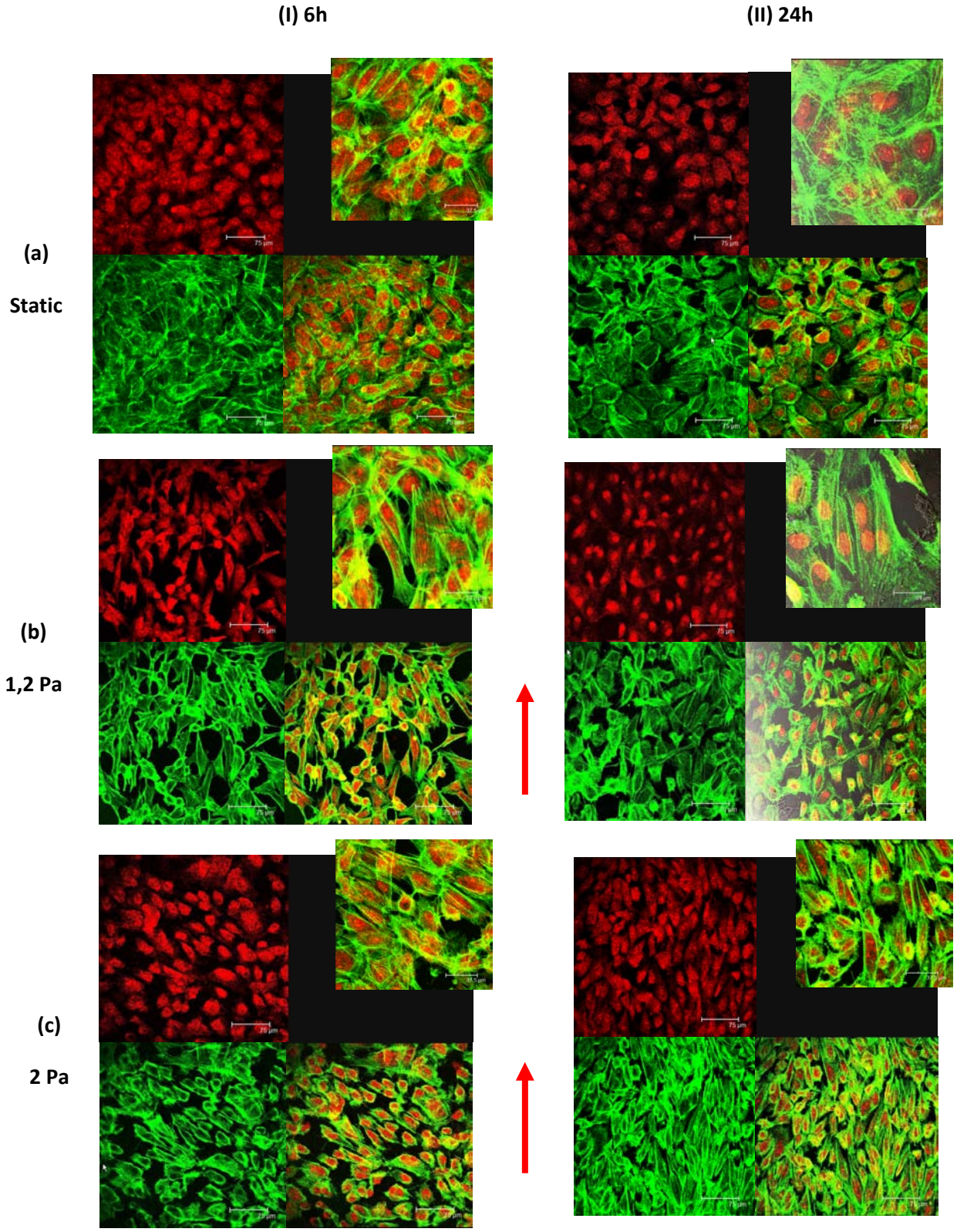


Figure. 1

jjjj

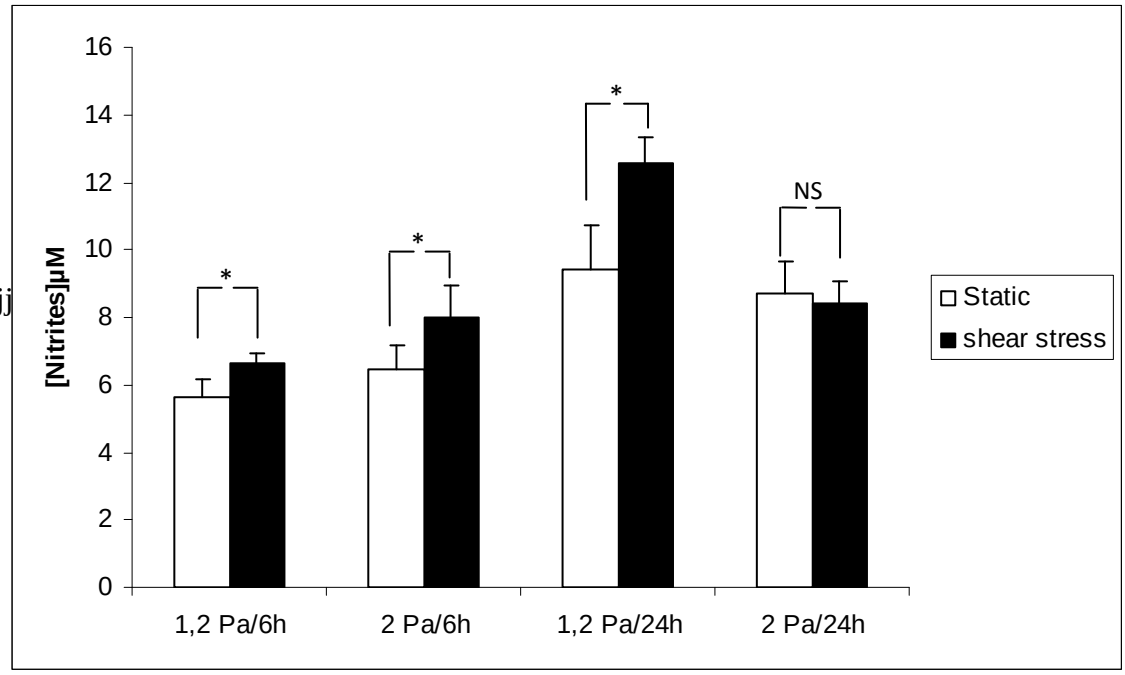


Figure. 2

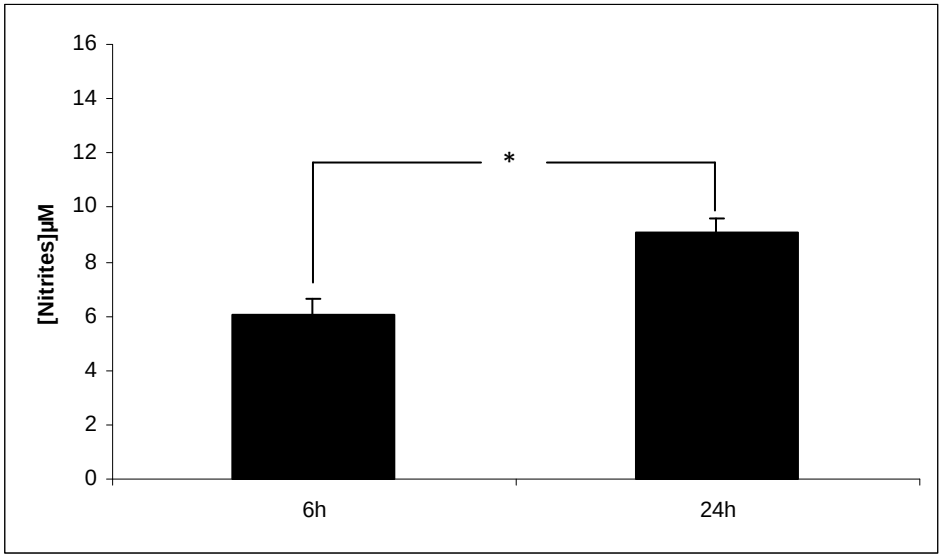


Figure. 3

MECHANICAL FORCES AND VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

LES CELLULES ENDOTHELIALES ET LES CONRAINTES MECANIQUES

KADI A.*[1], DECOT V.*[1,2], MENU P.[1], MULLER S.[1], BENSOUSSAN D.[1,2], STOLTZ JF[1,2].

[1]Nancy Université-UHP and CNRS, UMR 7563 et UMR 7561 Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire - Faculté de Médecine – 54500 Vandoeuvre les Nancy – France

[2]CHU and Cell and Tissue depart - 54500 Vandoeuvre les Nancy – France

The two first authors have participated equally to this work.

Correspondence to:

KADI Assia

Groupe Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Faculté de Médecine, Bat E

9, avenue de la forêt de Haye

54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

France

Tél: 33. (0).83.68.34.74

e-mail: assia.kadi@medecine.uhp-nancy.fr

Summary

Almost all of the cells of the human body are subjected to mechanical stress. For endothelial cells, mechanical stress can vary from some milli-Pascal (shear stress) to some Pascal (hydrostatic pressure). Today it is know that mechanical forces have a decisive part in cellular physiology. However, if the main biological effects of mechanical stress are well documented. The mechanisms between mechanical forces to physiological phenomenon remain nearly unknown (mechanotransduction phenomenon). In this work, through personal results and published works, authors considered the effects of mechanical stress and possible hypothesis.

Key-words: endothelial cells; mechanobiology; mechanotransduction, shear stress; G-protein; eNOS.

Résumé

Dans le corps humain, presque toutes les cellules sont soumises à des forces mécaniques. Dans les cellules endothéliales, ces forces peuvent varier de quelque milli pascale (cisaillement) à quelques pascals (pression hydrostatique). Les forces mécaniques ont un rôle très important au niveau de la physiologie cellulaire. Toutefois, si les effets biologiques de ces forces mécaniques sont bien connus, les mécanismes cellulaires qui y sont impliqués ne le sont pas encore. L'étude de ces mécanismes fait partie d'un vaste domaine de recherche appelé la mechanotransduction. Dans cette revue, nous avons exposé puis discuté les différentes réponses cellulaires à un stress mécanique, en évoquant les protéines impliquées dans les voies de transduction du signal.

Mots-clés: cellule endothéliale, mechanobiologie, mechanotransduction, cisaillement, protéines G, eNOS.

I – INTRODUCTION: MECHANOBIOLOGY – MECHANOTRANSDUCTION

Cells in the body are permanently subjected to different forces (blood pressure, forces related to the flow…). Those vary from Pascal –Pa– (shear stress on the vascular wall) to MegaPa(MPa) (forced on the cartilage of the hip). Recently, it was shown that these forces were likely to influence the cell physiology. One of the first observations was done by Wolff, a German surgeon who studied the adaptability of the bone. At the same time, Roux (1181) proposed the concept of adaptation which defined tissue remodelling "***Many cells are influenced by functional stimuli****, the nerve, muscle, gland cells by the related (electric) pulse, bone cells and* ***connective tissue cells by pressure and tension…*** *It is plausible that, if this influence is disadvantageous for some cells of a tissue or some parts of it, then these cells will disappear during the process of physiological regeneration. If, however, variations appear for which the functional stimulus are favourable, then in the course of time these cells will replace all the other cells, which are indifferent to the functional stimulus".*

At the interface between Physics and Biology, cell mechanics knew a conceptual revolution during the 30 last years with the possibility to measure forces of picoNewtons and nanometric deformations. It was then possible to better understand the relation between local mechanical parameters and cell functions (concept of Mechanobiology).

If the biological effects of mechanical forces on cells and tissues are now relatively well described, the mechanisms explaining the passage from a mechanical stimulus to a physiological phenomenon (ex: secretion, receptor expression, gene activation…) remain understood. It is admitted today that these phenomena proceed in 4 steps:

a) *Mechanical coupling* which induces transformation of the applied force into a detectable force by the cells or induction of a physical phenomenon (ex: modification of receptors, electrokinetic potential induce of flow...).
b) *Mechanotransduction* itself which corresponds to the action of force on specific structures. The transduction of mechanical signals could affect the properties of the cells.
c) *Transduction of signal*: conversion of mechanical signals into intracellular physiological signals.
d) *Cell response*: regulation of genes, release of autocrine or paracrine factors, expression of specific receptors…

If steps (c) and (d) are almost well described, knowledge of steps (a) and (b) requires development of models and experimental approaches specific to each type of cell studied (ex : distribution of forces on and into the cell, polymerization and orientation of the cytoskeleton…).

II- INFLUENCE OF THE MECHANICAL FORCES ON VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS (EC)

II-1- Mechanical forces acting on the vascular wall

The mechanisms by which endothelial cells identify the different mechanical forces and convert them into physiological and biochemical signals remain generally unknown. Molecules at the cell surface are ideal candidates because they have a direct interaction with circulating blood. These molecules can be directly activated by a physical movement (conformational change) or indirectly by molecular gradients (which change ligand-receptor interactions). These membrane structures or “mechanoreceptor candidates” include integrins, ion channels and G proteins, tyrosine kinase receptors… These mechanoreceptors can trigger biochemical cascades in the cytoplasmic side of the plasma membrane through to second messengers release (centralized mode of the mechanotransduction). Thus activation of the proteins kinases is followed by stimulation of cytosolic transcription factors, and/or regulation of the gene transcription in the nucleus.

Another way to transduce the signal induced by stretch or shear stress is related to the interaction of mechanoreceptors with cytoskeletal elements themselves activated by flow. By using a “decentralized” mode of mechanotransduction, transmission of signal can be done by connection with the cytoskeleton (focal adhesion, cell-cell junctions, and membrane receptors) and leads to a greater diversity of cell responses. Some of these responses induced by molecules of intracellular signalization (second messengers) are fast, of about a second or a minute (changes of the ion permeability, production of inositol triphosphate, intracellular release of Ca^{2+}, activation of the adenylate cyclase…), while other responses are developed in hours following the signal (genes modifications, cytoskeleton, changes of the cell shape and oriention…).

In vivo the ECs are subjected to 3 types of mechanical forces with variable intensities: shear stress (τ, some mPa), hydrostatic pressure (p, some Pa) and periodic parietal deformation (ε, 0 to 3 Hz).

The shear stress (τ) induced by the blood flow acts tangentially on ECs. It is generally determined by the relation of Poiseuille: $\tau = 2Q\ \mu\ /\ \pi\ D$ where Q is the flow rate μ the dynamic viscosity and D the diameter of the vessel.

The hydrostatic pressure acts perpendicular to the surface of the endothelium. It influences the extracellular matrix as well as on the endothelium. At the macroscopic scale, the blood flow is generally laminar. However, the geometry of vessels near vascular singularities (junctions, stenosis,…) predispose with separation of the flow and appearance of swirls. In these areas, the shear stress and the pressure present great fluctuations in amplitude and direction on short distances. At the microscopic scale, it should also be noted that the distributions of the shear stress and of the pressure on the surface of each EC are not uniform and are dependent on the topography of cell surface [1].

In addition to the shear stress and the pressure, the arterial endothelium is submitted to a periodic deformation of the wall related to cardiac cycle. The deformation ($\mathcal{E}$) is classically measured is the average circumferential deformation, (relative variation of diameter: $\mathcal{E} = (D-D_0 / D_0$ with $D-D_0$ diameter between systole and diastole)).

II-2- Effects of the shear stress on the EC: mechanotransduction

In 1968, Fry [2] described modifications of the vascular endothelium in relation to the wall shear stress. In 1981, Dewey and al [3] showed the dynamic response of ECs with regard to shear stress.Nerem et al suggested that the morphology of the EC could be an indicator of the local hemodynamic conditions. During the last ten years, the influence of the local hemodynamic conditions on the EC raised and increasing interest. The most recent works underlined the determining role of local flow conditions in their properties [4, 5]. These modifications are described under the term of mechanotransduction. It is also admitted that endothelium is the main actor in the processes of signal transduction that control vasomotion and various functions of vascular wall [5].

II-3- Distribution of mechanicals forces

The variations of the distribution of the shear stress can help to explain the various responses of EC to flow. Full-course of EC being “rough”, the sensitivity of a cell can be considered by the fraction of surface exposed to a force above a critical value.

In addition to the variations of the distribution of forces between cells, the distribution of subcellular forces is variable in space. In this case, the localization of mechano-receptors or sensitive elements on cell surface can be a key factor. One can imagine that the sensitivity of a cell is determined by its form as well as by the localization and activation of mechano-elements on cell surface. Moreover, if we agree with the hypothesis of the presence of mecano-receptors on the membrane surface, their distributions are also a determining factor. A membrane receptor would be sensitive to the flow depending to the level of the forces in the areas. Thus, a particular flow would not cause a cell response if its receptors are localized in a region where the force is lower than a defined threshold [5, 6].

II-4- Responses of EC to shear stress

a) Cell morphology

Morphological changes corresponding to the lengthening and the orientation of EC parallel to the direction of the flow and the reorganization of the cytoskeleton are responsible for motility and cell adhesion [7-8]. With low shear stress, in vivo and in vitro as well, the EC shows a polygonal form and are lengthened in comparison with the EC subjected to a high shear stress [11-13]. In addition, the morphological changes of EC are variable according to their localization (connections, junctions) and the conditions of the flow (laminar periodic or disturbed flows, presence of vortex, etc.) [14-17]. (Fig.1).

All elements of the cytoskeleton (actin filaments, microtubules, intermediate filaments…) undergo reorganization during the application of the shear stress, influenced by the amplitude and the period [16, 19, 20].

At rest, EC show dense peripheral bands (DPB) with stress fibbers ending in DPB areas. Proteins related to the cytoskeleton, such as: vinculins, Zyxins, VASP proteins (vasodilatator stimulated phosphoprotein) are associated at the ends of actin filaments to the periphery. Following a prolonged shearing, EC are oriented in the direction of the flow. In the cell, stress

fibbers and microtubules, as well as the intermediate filaments are aligned according to direction of the flow [21-25]. This reorganization of the cytoskeleton will have a direct action on various cell signalling, in particular on protein phosphorilation (such as the VASP) known to be the substrates of the proteins kinases A (PKA), or enzymes implicated into mechanotransduction. It will also have an effect on the properties of ECs, such as adhesion, release of Von Willebrand factor, NO production,...

b) phosphorylation of the Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (V*ASP)*

VASP proteins are closely related to the reorganization of the cytoskeleton in the development and the repair of the endothelium, this phenomenon is important in the comprehension of vascular diseases. Phosphorilation of VASP triggered by mechanical forces, results in binding of VASP to the adhesion focal points of cytoskeleton components, such as vinculin or actin. Study of proteins phosphorylation in cells subjected to the shear stress of various durations and amplitudes as well as the analysis of the interactions between VASP proteins and actin fibbers allowed us to demonstrate the existence of various phenomena and the presence of interactions between cytoskeleton and VASP:

c) Localization of adhesion molecules

We observed that EC activation involves an increased expression of adhesion molecules such as ICAM-1, (ligant of leucocyte integrin), which support firm adhesion. In addition, during the application of a shear stress, ICAM-1 migrated towards the apical pole of the EC via the cytoskeleton to create an open area accessible to circulating adhesive cells (leucocytes …).

d) Regulation of Von Wilebrand factor (VWF)

Von Willebrand factor is a multimeric glycoprotein (GP) which is involved in platelet adhesion and is also the transporter for the procoagulant factor VIII. It is synthesized in the Weibel-Palade bodies and is considered as a good marker of EC. It also plays a significant role in the atherosclerosis process which is itself in relation with shear stress on the wall. We showed an increase of vWF synthesis in cells exposed to a high shear stress amplitude (1,0Pa) during 24h, but not in cells exposed to a low shear stress (0,2Pa), showing that the local

hemodynamic conditions (variation of the shear stress in vascular stenosis, etc) play a determining role in thrombosis and the atherogenesis via regulation of the release and the synthesis of vWF whereas the TNF-α induced a release of vWF simply.

e) Translocation of Caveolin-1

The caveolae are constituted by membrane microdomains implied in the mechanisms of mechanotransduction, due to their localization at the level of the ion channels and their properties of transport of macromolecules. Caveolin-1, constitutive protein of these microdomains, play a role as element of activation of the transduction molecules. Variations in their expressions were studied following to various mechanical and biological stimuli (TNF-α). We thus found a significant modification in the distribution and expression of caveolin-1 in ECs exposed to a laminar flow and change in the spatial distribution according to the time. More precisely, the caveolin-1 concentration was higher in the areas of high shear stress. Moreover, caveoline-1 expression increased following after of 24h shearing. On the other hand, TNF-α induced a reduction in the expression of caveolin-1 following 24h stimulation and inhibition of F-actin polymerisation blocked the redistribution of caveolin-1. These results show that the shear stress induces a translocation of caveolin-1 and that there is a correlation between this redistribution of caveolin-1 and the organization of F-actin in the EC.

It is possible that the molecules responsible for the transduction of mechanical signal are activated during their separation with caveolin-1. Consequently, changes of conformation or localization of caveolin-1 by the shear stress could play a significant role in the mechanotransduction.

f) eNOS activity

eNOS catalizes the reaction producing nitric oxide (NO) from L-arginine. eNOS is regulated by a variety of transcriptional post transcriptional and post translational mechanisms. Protein-protein interactions represent an important posttranslational mechanism for regulation of eNOS activity. It has been shown that calmodulin serves as an allosteric activator for eNOS and that caveolin directly interacts with and inhibits eNOS. The binding of Ca^{+2}-calmodulin to eNOS disrupts the inhibitory eNOS-caveolin complex, leading to enzyme

activation. Su et al reported that eNOS is localized to specific cellular domains in endothelial cells including Golgi and plasmalemmal caveolae. These later interact with actin microfilaments and microtubules. Thus reorganization of cytoskeleton may influence NO production by affecting the function of caveolae proteins, including eNOS. Cucina et al [10] found that shear stress induces EC rearrangement of actin filaments and microtubules with the major axes of the cell, and Hutcheson et al reported that shear stress induced actin filaments rearrangement provides a transduction pathway between shear stress and NO production and Su et al [26] demonstrated that the polymerisation state of the actin cytoskeleton regulate NO production and eNOS activity. Later, Harrison et al [27] reported that laminar shear stress causes an increase in eNOS mRNA and protein, permitting the EC to produce larger amount of NO. This up-regulation of eNOS expression involved a transient increase in eNOS mRNA transcription and a sustained increase in eNOS mRNA stability. The signalling pathway leading to increased eNOS transcription involves a classic MAP kinase pathway involving activation of the tyrosine kinase cSrc and subsequently activation of Ras, Raf, MEK ½ and Erk ½ (Fig. 2).

g) Intracellular Responses

Since about years, the EC response to mechanical forces was largely studied and variations of a high number of cell functions were reported (electrophysiology, biochemistry, receptors, regulation of gene, etc) [4, 5]. Effects of brutal or chronic shearing were studied *in vitro* [28, 29]. The various responses of the EC to mechanical forces can be classified according to the reaction time, although they are often simultaneous (tables 1). For example, the fast electrophysiological changes in the membrane potential (of about a second) and the activation of the biochemical cascades occur in a similar characteristic time. G protein activation, release of NO, mobilization of derived the phosphoinositides, release of intracellular Ca^{2+}, phosphorylation of cyclic nucleotides, etc, require longer times.

<u>Table 1</u>: Main responses of the EC to shear stresses

Time	Responses	Physiological significance	Authors
seconds	Activation of potassic channels	– Selective opening of the K^+channels	[30]
	Activation of secondary messengers (IP_3, DAG, $CA^{2+,}$ PKC, protein-G…)	- activation of the signal transduction (e.g. activation of the Ca^{2+}- dependent pathway)	[31-34]
	Release of NO	- flow - dependent Vasorelaxation	[34, 35]
minutes	Release of PG	- Vasodilatation and anti-thrombosis	[36]
	Activation of MAP Kinase	- Signal transduction	[37]
	Activation of NFκ b Regulation of SSRE-dependent PDGF-B	- Activation of the transcription - Régulation of cell proliferation	[32, 38]
>1 h	SSRE-dependent Regulation (PDGF, OUR, tPA, TGFβ1, ICAM-1, c-fos, MCP-1 etc)	- Regulation of the cell growth - Flow – dependent Vasorelaxation - Increase in the fibrinolytic activity - Cell Adhesion - signal transduction - Monocytes recruitment	[32, 39-42]
>6 h	ET-1 : increase (weak shearing) ; reduction (>0.6Pa)	- Vasoconstriction	[34, 36]
	VCAM-1 : reduction	- cell adhesion	[43, 44]
	Rearrangement of the Cytoskeleton Alignment of focal adhesion sites Rearrangement of cell organelles (MTOC, Golgi, etc).	- Mechanisms of changes of cell morphology	[20, 45]

	Cell proliferation Increase : turbulent disturbed No change or reduction: laminar	- EC Prolifération	[35, 45]
	Changes of morphology (>12h) Rearrangement of Fn	- Adaptation to flow	[6, 45]
	Negative regulation of Tm	- Anti-thrombosis mechanisms	[46]
>24 h	Increase of cell surface rigidity	- Reduction in the cell surface deformability	[47]
	Alignment and elongation of the CE.	- Morphology adapted to flow	[19, 20]

h) genes Regulation (Table 2)

Regulation of gene expression of molecules synthesized by EC, like ET-1, PAF [48], PDGF A and B [32], MCP-1) [41], adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) [40], is influenced by the flow. Thus, expression of PDGF-B and FGF are increased in EC and in the smooth muscle cells (SMCs) vascular when subjected to forces of shearing. The expression of PDGF-B in EC is dependent on a sequence of 12 nucleotides (SSRE) in the promoter region of PDGF-B gene while is distinct from sequences of interaction with well know transcription factors. This same team showed that in another gene, coding for ICAM-1 which is involved in inflammation, increased when EC were subjected to shearing forces: Whereas expression of VCAM-1 and ELAM-1, whose promoter region are deprived from SSRE sequence, was not affected under the same conditions. These observations suggest that the SSRE sequence was not affected under the same conditions. These observations suggest that the SSRE could be present in the EC and activated by mechanisms of mechano-transduction. The other transcription factors which take into the activation of promoters by shear stress are the nuclear factor kappa B (NF-KB), the activating protein-1 (AP-1), the early-1 growth promoter (Egr-1) c-fos, c-jun, c-myc and of stable (Sp-1) [49, 50]. The variations observed in gene regulation

suggest that two types of gene elements sensitive to shear stress (positive and negative) may exist end moreover, of the multiple regulations in company of the other factors.

The gene expression in response to the flow can be classified in three types: early transitory increase, continuous increase expression of mRNA and biphasic regulation: Table 2 summarizes the main levels of regulation of molecules or genes transcription (ARNm level) of molecules by the shear stress.

Table 2: Regulation of genes transcription by shear stress (according to Stoltz et al. 2000, 2002) [51, 52].

Genes	***Cells used***	***Response of the ARN***	***SSRE***	***Other factors***
ET-1	*HUVEC/BAEC*	*Biphasic*	-	*AP-1*
VCAM-1	*HUVEC*	*decrease (τ strong)* *increase (τ low)*	-	*AP-1, NF-κB*
ACE	*RAEC*	*decrease*	+	*SSRE,AP-1,Egr-1*
TF	*BAEC*	*increase*	-	*Sp-1*
TF	*HAEC/HUVEC*	*increase*	-	*Egr-1*
Tm	*HUVEC*	*Biphasic*	-	*AP-1*
PDGF-A	*BAEC*	*Biphasic*	+	*Egr-1*

PDGF-B	*BAEC*	*Biphasic*		
ICAM-1	*HUVEC*	*increase (or biphasique)*	+	*AP-1,NF-κB*
TGF-β	*BAEC*	*increase*	+	*AP-1,NF-κB*
c-fos, c-jun	*HUVEC*	*increase* *precociously transitorily*	+	*AP-1*
eNOS	*HUVEC*	*increase*	+	*AP-1,NF-κB*
MCP-1	*HUVEC*	*Biphasic*	+	*AP-1,NF-κB*

ACE : Angiotensin-converting enzyme ; TF : tissue Factor ; c-fos and c-jun : members of proto-oncogen family ; eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase ; AP-1 : Activator Protein-1 ; NF-κB : Nuclear Factor-κB ; Egr-1 : Early Growth Response Factor-1 ; SSRE : Shear Stress Response Element.

III – POTENTIAL MECHANORECEPTORS

The response of EC to mechanical stimuli relates to practically al the mechanisms dependent on growth, cell metabolism and their functionality. However, mechanisms remain hypothetical: how and by which “sensors” on the EC receive these mechanical stimuli and convert them into biochemical signals?

Molecules which present at the luminal cell surface are at first sight the ideal candidates because they are in direct contact with circulating blood (Fig.3). These molecules can be

activated directly by a physical displacement (conformational change) or indirectly by transfer of gradients (which change the interactions ligant-receptor). These membrane structures or mechanoreceptors include ion channels, integrins, G proteins related to the receptors and receptors tyrosine kinase, caveolae…

These mechanoreceptors can induce cascades of response from the plasma membrane, through release of biochemical second messengers (centralized mode of mechano-transduction). Thus activation of protein kinase is followed by stimulation of cytosolic transcription factors, and/or regulation of gene transcription in the nucleus [53].

Another way of signal transduction can be related to the interaction of mechanoreceptors, activated by flow, with elements of the cytoskeleton. By using a "decentralized" mode of mechanotransduction, the signal transmission would be induced then via connections with the cytoskeleton (sites of focal adhesion, cell-cell junctions, nuclear membrane) which would lead to the great diversity of cell responses.

Some of these responses are fast, of about a second or of a minute. Other responses develop in the hours following the birth of the signal (cf. table 1).

III-1 Integrins

Integrins are responsible for the cell adhesion and migration on the extracellular matrix. Via their interactions with other molecules, they initiate the modulation of cytoskeleton organization. They are largely implied in the regulation of the embryonic development, apoptosis, hemostasis, recruitment and activation of the leucocytes and retraction of the blood clot. At the time of connection to integrins, ligands bind firmly or gather the integrins while binding to the adjacent molecules on the cell surface. The connection or the assembly of integrins leads to the formation of focal adhesion where the integrins bind to intracellular cytoskeletal complexes and indirectly with the actin filaments. The displacement of a transmembrane integrin could communicate the force with the cytoskeleton through protein/protein interactions in the cytoplasmic side of membrane. For example β1 integrin receptor of the extracellular matrice can induce the formation of a focal adhesion sites and induce a force-dependent signal. The cytoskeleton rigidity would increase with the applied pressure, thus would require intact microtubules as well as intermediate filaments and microfilaments.

Following this connection, closes integrins with their ligands, they “integrate” the external signals given by other cells or extracellular matrix components to which they adherent, signals which they transmit inside the cell while joining the cytoskeleton and by starting signal transduction. These signals lead to the hydrolysis of phospho-inositols and thus to the increase in intracellular Ca^{2+}, with phosphorylation of several proteins, in particular activation of tyrosine kinase of focal adhesion ($pp125^{FAK}$) and to the induction of various genes.

The application of shear stress causes a fast activation of protein kinase, among which ERK (extracellular signal-regulated kinase) and JNK (c-Jun-terminal kinase). While lead to the transcriptional activation of early genes such as those coding for MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) and c-fos [41]. These activations are modulated by the Ras protein, whide is itself controlled by S.O.S. protein. However, in response to many growth factors such as the PDGF (platelet derived growth Factor) or the EGF (Epidermal growth Factof), the protein adaptor Shc (Src homology2/alpha collagen) is phosphorylated on tyrosine residue and interact with phosphor-tyrosines of tyrosine Kinase receptor through binding to SH2 (Src homology domain-2). Following phosphorylation, Shc can also interact with G2b2 (Growth Factor receptor-binding protein-2) through SH2 binding. Shc-Grb2-S.O.S. provides then an alternative way of signalling in addition to Grb2-S.O.S. transduction used by the Ras protein.

III-2- Ion channels

The phospholipid bilayer of the cell membrane has a great permeability to polar molecules of small sizes and hydrophobic molecules, while it is highly impermeable to ions and charged molecules (fig. 3). Specialized membrane proteins (channels and transporters) are responsible for the specific ions transfer through the membrane. The ion channels and the ion exchangers are thus potential mechanoreceptors [45]. The K^+ion channels modified by the stretching of the membrane would have their activity modified in response to mechanical forces. Thus, Olesen et al [30] identified a current K^+ selective by activated by the shear stress. This polarizing membrane current is a function of the shear stress, reaching half of its maximum of activation with 0,7 mPa.s. It is quickly activated by the shear stress (a few seconds), slowly increases (in a few minutes), and completely returns to the normal when the flow is stopped. Nevertheless, it is not certain that the activation of these channels is a primary response to the shear stress.

By the same way, many channels are used by calcium which can activate many ways of signalling, among which one particularly stimulates the production of NO and consequently vasodilatation of vessels [55]. It was proposed that the mechanisms depending on intracellular calcium concentration can play a significant role in the early and transitory responses, whereas [Ca^{+2}] independent mechanisms changes would be significant in the late and prolonged responses. The [Ca^{+2}] dependent mechanism is likely to be responsible for the fast response and the transitory flow, such as fast activation of eNOS. In addition, intracellular calcium plays a crucial role in the cytoskeleton reorganization and the alignment of the EC subject to a flow. On the other hand, the calcium-independent pathway induces activation of GTPases binding to GTP and stimulation of PKC and calcium-independent MAP kinase.

III-3- Receptors link with the G proteins

Stimulation of many membrane receptors is retransmitted by a class of specific proteins, that blind to GTP (Guanosine Tri-Phosphate), those are G proteins. They operate the coupling of the receptors with intracellular effectors, and for this reason exert a significant control on the signal transmission. Interactions between receptors and their second messengers are mediated by enzymes or ion channels activated by the interaction with G proteins. G proteins are heterotrimeric proteins, constituted by a sub-unit α bound with the heterodimer $\beta\gamma$. The α sub-unit binds to GTP, hydrolysis in GDP (Guanosine Di-Phosphate) then induce the response of the majority of effectors. A receptor coupled to a G protein at rest is activated by the binding of a specific agonist. The change in the conformation of the agonist-receptor complex, induced by this interaction, allows the activation of the exchange of GDP by GTP and thus activation of the G α and G β/γ sub-units which will control the membrane or cytosolic activity of various effectors. The release of the phosphatase activity, wihin the G α sub-unit induces the re-association of the G α and G β/γ sub-units and leads to a return to the initial state.

The amplification of the signal triggered by an extracellular modulator follows two steps. The former is related to the activated receptor which can activates many G proteins in cascade ; in the later, the α-GTP sub-unit maintains the amplified activation as long as the GTP is not hydrolyzed in GDP. Recently, it was been shown that activation of G protein is one of the earliest events in the signalization induced by flow [56]. Following this work, a

new study highlighted selective changes specific to the nature of the G protein stimulated, in correlated with changes in the signalization and the functionality of G protein [57]. Thus, receptors related to the G proteins can be also considered as potent-transducers and, downstream, as signal devices.

III-4- Rho (small GTPase) involvement in signal transduction

Many of endothelial functions have been related to the small GTPases proteins of Rho family. GTPases are regulatory molecules that link surface receptors to the organization of the actin cytoskeleton and regulate fundamental cellular process [58]. The Rho subfamily of small GTPases includes RhoA, RhoB and RhoC; RhoA is the best characterized and has been shown to be involved in cell adhesion, migration, cell growth response and gene expression. Relatively less is known about RhoB and RhoC. RhoB has been shown to be immediately early inducible and to inhibit cell growth and induce apoptosis. RhoC, on the other hand, is expressed in certain forms of cancer [59]. Zhu Y et al and Trisma et al [60, 61] illustrated the role of Rho proteins in shear stress signalling and reported that Rho GTPases regulate stress fibers of the cytoskeleton whose assembly is tighly regulated by shear stress. It has been shown that Rho translocates to the membrane in response to the shear stress, presumably indicating its activation. Wojciak- Stothard et al [62] found an increase in RhoA activity at 5min of shearing, this increase is correlated with the formation of numerous stress fibers, and a subsequent decrease in the activity after 15-30min which correlated with a loss of stress fibers, and a small increase in RhoA activity at 2h corresponded to the stage when most of cells were realigned within the direction of the flow. They reported that Rho proteins are required for shear stress-induced orientation and migration under dynamic conditions.

Increasing evidence has suggested the close relation between the activation of RhoA and the dysfunction of eNOS [63]. It is evidenced that phosphorylation of eNOS also modulates eNOS activity. Studies showed that Ser-1177 of human eNOS is phosphorylated directly by protein kinase B (PKB)/Akt, which results in an increase in electron flow through the reductase domain and increase NO production. Ming et al [63] demonstrated that Rho pathway negatively regulates eNOS phosphorylation through inhibition of PKB. Later, Sugimoto et al [64] demonstrated that RhoA/Rho-kinase pathway is thought to suppress eNOS activity by dephosphorylation of eNOS at Ser1177 via inhibition of Akt phosphorylation by PI3K, and phosphorylate the enzyme at Thr495. Under these conditions

eNOS is inactive because phosphorylation at Thr495 interferes with CaM binding to eNOS and interrupts the electron flow. Other findings reported that the anti-atherosclerotic effects of statin involve both an increase in eNOS activity and inhibition of RhoA activity [60]. Al these findings indicate that small proteins G have an important role in mechanotransduction.

III-5- Receptors of tyrosine-kinase (RTK)

Following stimulation, Transmembrane proteins induce signalling events. Their common characteristics are the presence of a single transmembrane segment and an intracellular field having catalytic activity of the protein tyrosine-kinase type. The interaction of ligands involves the dimerization of receptors which allows the activation of kinase carried by each of the two chains and the assembly to the adjacent sequence target also carried by the two chains. This allows intermolecular cross phosphorylation at several tyrosine residues. The phosphorylated dimmer represents the activity receptor. It contains a whole series of phosphorylated tyrosine residues which have the capacity to bind to proteins and form signalling complexes. Moreover, the dimerized and phosphorylated receptors have the potential to phosphorylate these targets proteins. The analysis of the sequences which bind to the phosphorylated receptors showed that the majority contain SH2 domains. Other contains PTB (PhosphoTyrosine Binding Protein) domains. Thus, assembly of signalling complexes depends on recruitment of protein receptors having SH2 or PTB domains by phosphorylated tyrosines. Among, many proteins containing SH2 domains bind the RTK domains to form complexes. Some of these proteins themselves are phosphorylated at the end of this association.

III-6- “Mechano-sensors” and Interactions

In order to identify new interactions between various mechano-sensors, we particularly analyzed two different steps of mechano-transduction phenomenon: the early response, the interactions integrins-shc and a step downstream, relative to the JNK activity [65].

Specific inhibitors of integrin interaction sites (RGD), intracellular calcium (BAPTA/AM) and G proteins (PTX), allowed to confirming the existence of interactions within the EC leading the adaptation of the cell to mechanical forces. Indeed, the exposure of

ECs to a laminar flow constant armature resulted in the fast formation (in half an hour) of new intracellular complexes between integrins αv $\beta 3$ and Shc proteins. Moreover, the information of these complexes in response to flow is partly dependent on the intracellular concentration of calcium and on G proteins activity. This step is in addition essential to the later response of the EC to shear stress such as activation of JNK, via integrins interactions, the intracellular presence of calcium and the catalytic activity of the G_i proteins.

Mechanical forces would activate at a first step mechano-sensitive sensors. This initial step would be followed by intervention of second messengers: Intracellular Ca^{2+}, protein kinase C (PKC), G protein, Adenosine monophosphate (AMP) cyclic and guanosine monophosphate (GMP) cyclic, etc. These changes in the balance of the second messengers involve a change of the activation state of "DNA binding factors" [32, 34, 66].

The final step results in a damaging of transcription activity of many genes via brief replies to local shear stress such as: Shear Stress Response Element (SSRE) with positive or negative effects, or a combination of both, acting with various steps.

IV- CONCLUSION

It is known today that mechanical forces induce many key events in the physiopathology of the vascular endothelium. To illustrate this phenomenon, Papadaki and Eskin proposed, in 1997, a first diagram summarizing the signalling pathways of "multiple responses" activated by shear stress within EC. The activation of one or several mechanoreceptors induced biochemical events which lead intracellular changes in the metabolic and gene expression, controlling thus cell functions. This concept, comparatively to the identification of mechanoreceptors and the responses of other cells (chondrocyte, osteoblasts) to mechanical forces should make it possible to a best understanding of cell mechanoregulation.

REFERENCES

1- Waché P., Wang X;, Maurice G., Lucius M., Stoltz J.F. Calcul numérique de la déformation mécanique d'un modèle de cellule endothéliale. C.R.A.S. Paris, t.328, Série IIb : 2000 ; 633-638.

2- Fry D.L. Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients. Circ Res 1968; 22 : 167-197.

3- Dewey Jr C.F., Bussolari S., Gimbrone Jr M., Davies P. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. J Biomech. Eng 1981; 103 : 177-185.

4- Reinhart W. Shear-dependence of endothelial functions. Experiencia 1994; 50 : 87-93.

5- Davies. P., Volin M., Joseph L., Barbee K. Endothelial response to hemodynamic shear stress: spatial and temporal considerations. In: Born G.V.R. and Schwartz C.J. Ed. New horizon series;, "Vascular Endothelium, Physiology pathology, and Therapeutic Opportunities" 1997; 3 : 167-176.

6- Barbee K., Mundel T., Lal R., Davies P. Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and non-aligned endothelial monolayers. Am J Physiol 1995; 268 : H1765-H1772.

7- Nerem R., Levesque M., Cornhill J. Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. J Biomech Eng 1981; 103 : 172-6.

8- Ookawa K., Sato M., Ohshima N. Morphological changes of endothelial cells after exprosure to fluid-imposed shear stress: differential responses induced by extracellular matrices. Biorheology 1993; 30 : 131-40.

9- Thoumine O., Ziegler T., Girard P., Nerem R. Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. Exp Cell Res 1995 ; 219 : 427-41.

10- Cucina A, Sterpetti AV, Pupelis G, et al. Shear stress induces changes in the morphology and cytoskeleton organisation of arterial endothelial cells. Eur J Vasc Endovasc Surg 1995; 9 : 86-92.

11- Franke R., Gräfe M., Schnittler H., Seiffge D., Mittermayer C. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. Nature 1984; 307 : 648-649.

12- Walpola PL, Gotlieb AI, Langille BL. Monocyte adhesion and changes in endothelial cell number, morphology, and F-actin distribution elicited by low shear stress in vivo. Am J Pathol 1993; 142 : 1392-1400.

13- Drenckhahn D., Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. Vascular endothelium physiology, pathology and therapeutic opportunities. in: Born G.V.R. and Schwartz C.J. Ed. New horizon series 1999; 73 : 1-25.

14- Davies P., Remuzzi A., Gordon E., Dewey Jr C., Gimbrone Jr. M. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83 : 2114-2117.

15- Helmlinger G., Geiger R.V., Schreck S., Nerem R. Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. J Biomech Eng 1994; 113 : 123-31.

16- Sato M., Ohshima N. Flow-induced changes in shape and cytoskeletal structure of vascular endothelial cells. Biorheology 1994; 31 : 143-53.

17- Truskey GA, Barber KM, Robey TC, et al. Characterization of a sudden expansion flow chamber to study the response of endothelium to flow recirculation. J Biomech Eng 1995; 117 : 203-210.

18- Kadi A, de Isla N, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P. Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells (Effect of rate and time of exposure). Clin Hemorheol Microcirc 2007; 37 : 131-140.

19- Girard P., Nerem R. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. J Celle Physiol. 1995; 163 : 179-93.

20- Galbraith C., Shalak R., Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. Cell motility and the cytoskeleton 1998; 40 : 317-330.

21- Birukov KG, Birukova AA, Dudek SM, et al. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2002; 26 : 453-464.

22- Osborn EA, Rabodzey A, Dewey CF, Jr., Hartwig JH. Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290 : C444-452.

23- Albuquerque ML, Flozak AS. Patterns of living beta-actin movement in wounded human coronary artery endothelial cells exposed to shear stress. Exp Cell Res 2001; 270 : 223-234.

24- Noria S, Xu F, McCue S, Jones M, Gotlieb AI, Langille BL. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. Am J Pathol 2004; 164 : 1211-1223.

25- Imberti B, Morigi M, Zoja C, et al. Shear stress-induced cytoskeleton rearrangement mediates NF-kappaB-dependent endothelial expression of ICAM-1. Microvasc Res 2000; 60 : 182-188.

26- Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR, Block ER. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 284 : C1542-1549.

27- Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. J Intern Med 2006; 259 : 351-363.

28- Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, et al. Shear stress and the endothelium. Kidney Int 1998; 67 : S100-108.

29- Braddock M., Schwachtgen J., Houston P., Dickson M., Lee M., Campbell C. Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells. News Physiol Sci 1998; 13 : 241-46.

30- Olesen S., Clapham D., Davies P. Haemodynamic shear stress activates a K^+ current in vascular endothelial cells. Nature 1988; 331 : 168-70.

31- Bhagyalakshmi A., Berthiaume F., Reich K. and Frangos J. Fluid shear stress stimulates membrane phospholipids metabolism in cultured human endothelial cells. J. Vasc Res 1992; 29 : 443-49.

32- Hsieh H., Li N., Frangos J. Pulsatile end steady flow induces c-fos expression un human endothelial cells. J Cell Physiol 1993; 154 : 143-151.

33- Berthiaume F., Frangos J. Flow-induced prostacyclin production is mediated by a pertussis toxin-sensitive G protein. FEBS Lett 1992; 308 : 277-79.

34- Kuchan M., Jo H., Frangos J. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. Am J Physiol 1994; 267 : C753-C758.

35- Gooch KJ. Tennant C. Mechanical forces: their effects on cells and tissues. Springer Verlag (Berlin) 1997; 2 : 15-53.

36- Frangos JA, Huang TY, Clark CB. Steady shear and step changes in shear stimulate endothelium via independent mechanisms--superposition of transient and sustained nitric oxide production. Biochem Biophys Res Commun 1996; 224 : 660-665.

37- Kadohama T, Akasaka N, Nishimura K, Hoshino Y, Sasajima T, Sumpio BE. p38 Mitogen-activated protein kinase activation in endothelial cell is implicated in cell alignment and elongation induced by fluid shear stress. Endothelium 2006 ; 13 : 43-50.

38- Grosjean J, Kiriakidis S, Reilly K, Feldmann M, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor signalling in endothelial cell survival: a role for NFkappaB. Biochem Biophys Res Commun 2006 17; 340 : 984-94.

39- Diamond S., Eskin S., and McIntire L. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. Science 1989; 243 : 1483-1485.

40- Sampath R., Kukielka G., Smith C., Eskin S., McIntire L. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. Ann Biomed Engin 1995; 23 : 247-56.

41- Shyy H.J., Hsien H.J., Usami S., Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. Proc natl Acad Sci (USA) 1994; 91 : 4678-82.

42- Stoltz J.F., Wang X., Dumas D., Payan E., Paulus F., Mainard D., Maurice G., Netter P., Muller S. Influence of mechanical forces on cells and tissues. Biorheology 2000; 37 : 3-14.

43- Musiał K, Zwolińska D, Polak-Jonkisz D, Berny U, Szprynger K, Szczepańska M. Serum VCAM-1, ICAM-1, and L-selectin levels in children and young adults with chronic renal failure. Pediatr Nephrol 2005 ; 20 : 52-5.

44- Miura M, Garcia FL, Crawford SE, Rowley AH. Cell adhesion molecule expression in coronary artery aneurysms in acute Kawasaki disease. Pediatr Infect Dis J 2004; 23 : 931-6.

45- Davies P. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. Physiol Rev 1995; 75 : 519-60.

46- Xu HL, Liu WB, Rao MR. Effect of sanchinoside Rg1 on experimental thrombosis and its mechanisms] Yao Xue Xue Bao 1997 ; 32 : 502-5.

47- Sato M., Levesque M., Nerem R. Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. Arteriosclerosis 1987; 7: 276-286.

48- Diamond S., Sharefkin J., Dieffenbach C., Frasier-Scott K., McIntire L., Eskin S. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. J Cell Physiol 1990; 143 : 364-371.

49- Resnick N., Gimbrone M. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. FASEB J 1995; 9 : 874-882.

50- Gimbrone MA, Jr., Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. J Clin Invest 1997; 100 : S61-65.

51- Stoltz J.F., Sun R.J., Muller S., Wang X., Zhuang F.Y. Regulation of von Willebrand factor of human endothelial cells exposed to laminar flow: a study in vitro. Clinical Hemorheology and Microcirculation 2000; 23 : 1-11.

52- Stoltz J.F., Wang X. From biomechanics to biomechanobiology. Biorheology 2002; 39 : 5-10.

53- Patrick C., McIntire L. Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells. Blood Purif 1995; 13 : 112-24.

54- Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. J Intern Med 2006; 259 : 381-392.

55- Himmel H.M., Whorton A.R., and Strauss H. C. Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. Hypertension 1993; 21:112-127.

56- Gudi S., Graig B., Frangos J.A. Fluid flow rapidly activates G-proteins in human endothelial cells. Circ res 1996; 79 : 834-839.

57- Redmond E., Cahill P., Sitzmann J. Flow-induced regulation of G-protein expression in cocultured vascular smooth muscle and endothelial cells. Artrioscler. Thromb. Vasc. Biol 1998; 18 : 75-83.

58- Cicha I, Goppelt-Struebe M, Muehlich S, et al. Pharmacological inhibition of RhoA signaling prevents connective tissue growth factor induction in endothelial cells exposed to non-uniform shear stress. Atherosclerosis 2008; 196 : 136-145.

59- Seasholtz TM, Brown JH. RHO SIGNALING in vascular diseases. Mol Interv 2004; 4 : 348-357.

60- Zhu Y, Liao HL, Niu XL, et al. Low density lipoprotein induces eNOS translocation to membrane caveolae: the role of RhoA activation and stress fiber formation. Biochim Biophys Acta 2003; 1635 : 117-126.

61- Tzima E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. Circ Res 2006; 98 : 176-185.

62- Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. J Cell Biol 2003; 161 : 429-439.

63- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. Mol Cell Biol 2002; 22 : 8467-8477.

64- Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K. Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2007; 361 : 462-467.

65- Labrador V., Chen K.D., Li Y.S., Muller S., Stoltz J.F., Chien S. Interaction of mechanotransduction pathways. Biorheology 2003; 40 : 47-52.

66- Morita T., Kurihara H., Maemura K., Yoshizumi M., Nagai R., Yazaki Y. Role of Ca^{2+} and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization nd endothelium 1 gene expression. Circ Res 1994; 75 : 630-36.

Figure legends:

Figure 1: Reorganization of the actin cytoskeleton and ECs orientation in the direction of the flow. Both F-actin and nucleii were visualized using Alexa fluor® 488 phaloidin (Green fluorescence) and Propidium iodide (Red fluorescence) respectively. Intensity of fluorescence was observed by confocal microscopy (Confocal microscopy: Leica, objective 40X, water immersion, NA 0.80, Germany). Arrows show direction of flow (Kadi et al 2007).

Figure 2: Unidirectional laminar shear stress increases endothelial eNOS mRNA expressionvia different pathways, both depending on the tyrosine kinase cSrc (Harrison et al 2006).

Figure 3: Schematic representation of receptors involved in initiating signalling pathways in endothelial cells stimulated by hemodynamic forces (Lehoux et al, 2006).

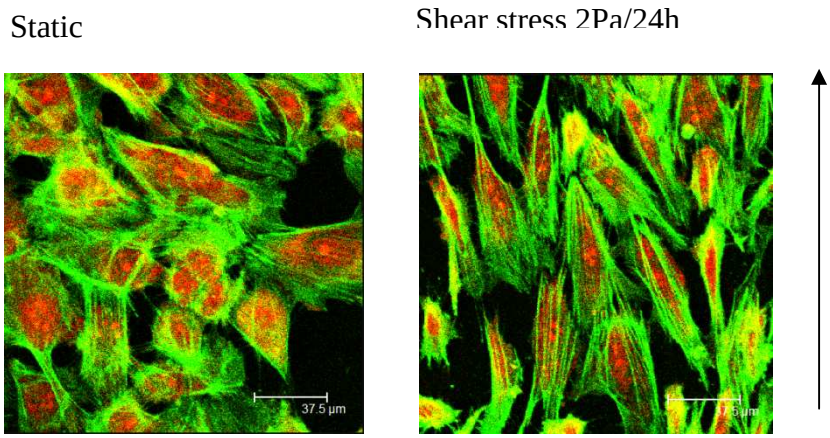


Figure 1

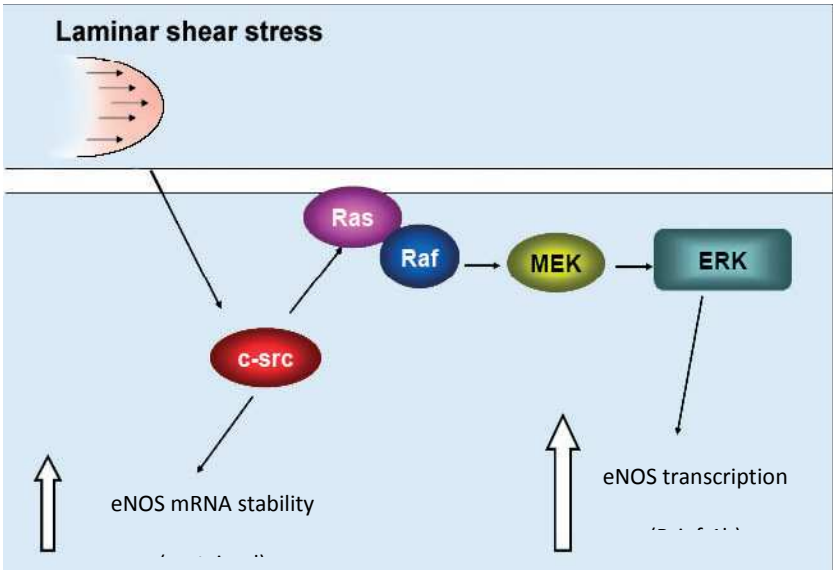

Laminar shear stress
Ras
Raf
MEK
ERK
c-src
eNOS mRNA stability
eNOS transcription

Figure 2

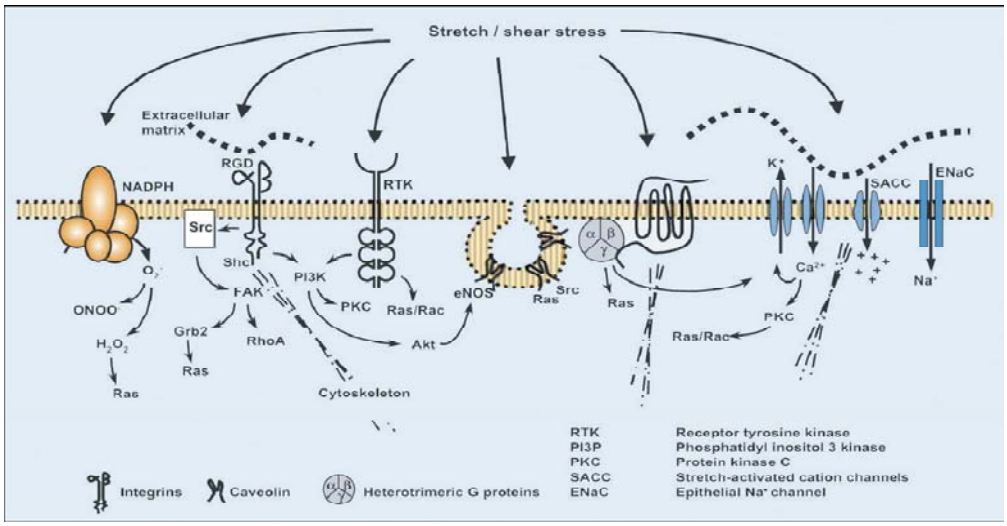

Stretch / shear stress
Extracellular matrix
RGD
NADPH
RTK
Src
Shc
PI3K
FAK
PKC
Ras/Rac
eNOS
Ras
Src
Ras
Akt
RhoA
Grb2
Ras
Cytoskeleton
ONOO⁻
H2O2
Ras
K+
SACC
ENaC
Ca2+
Na+
PKC
Ras/Rac
RTK Receptor tyrosine kinase
PI3P Phosphatidyl inositol 3 kinase
PKC Protein kinase C
SACC Stretch-activated cation channels
ENaC Epithelial Na+ channel
Integrins
Caveolin
Heterotrimeric G proteins

Figure 3

Résumé :

L'hypertension artérielle (HTA) constitue l'une des maladies les plus répandues dans notre société. L'une de ses causes consiste en une rigidité de la paroi artérielle. Cette dernière est régulée par une balance entre agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. L'oxyde nitrique (NO) est un vasodilatateur produit par les cellules endothéliales (CE) en réponse aux stimulations biochimiques (acétylcholine, insuline,…) ou mécanique (cisaillement). Son rôle principal consiste en la relaxation des cellules musculaires lisses (CML) afin d'adapter le vaisseau sanguin aux contraintes qui lui sont imposées. Il s'avère, selon la littérature, que NO est impliqué dans le mode d'action de certains médicaments dirigés contre l'HTA. Celui qui nous intéresse dans cette étude est le Nébivolol. Dans la littérature, il a été rapporté que la production de NO et la structure du cytosquelette d'actine sont intimement liées et que le Nébivolol entraîne la production de NO par les CE. Le but de ce travail a été d'étudier l'implication des filaments d'actine du cytosquelette dans le mode d'action du Nébivolol sur les CE, puis d'évaluer son impact sur l'activité de la eNOS. Nous avons trouvé que le Nébivolol entraîne une augmentation de la production de NO via la dépolymérisation des filaments d'actine pendant la première heure de culture. Cette dépolymérisation résulte en la libération, la translocation péri-nucléaire et la phosphorylation de la eNOS par les Akt. Au-delà d'une heure d'incubation avec le Nébivolol, les monomères d'actine se repolymérisent, entraînant la déphosphorylation de la eNOS et la diminution de la production de NO. Toutefois, il semblerait que la formation des fibres de stress ne soit pas le seul mécanisme d'inhibition de la eNOS. En effet, nous avons montré que la translocation de l'enzyme dans la région péri-membranaire contribue à son inhibition à la suite de la perturbation de l'organisation des filaments d'actine.

Mots clés : Nébivolol, eNOS, oxyde nitrique, cytosquelette d'actine, cellule endothéliale, β bloquant, contraintes de cisaillement.

Abstract :

Hypertension is one of the most widespread diseases which is caused by a rigidity of the vascular wall. The arteries rigidity is controlled by several vasoconstrictor and vasodilator agents. Nitric oxide (NO) is a vasodilator agent, produced by the endothelial cell (EC) in response to biochemical (acetylcholine, insulin,…) or mechanical (shearing) stimulations. Its main function is to induce smouth muscle cells (SMC) relaxation to adapt the blood vessel to the imposed forces. It has been shown in the literature, that NO is implicated in the target action of some drugs, as Nébivolol, which is directed against hypertension. We know according to the literature that NO production and the structure of the actin cytoskleton are linked and that Nébivolol induces NO production. The aim of this work was to study the implication of cytoskeleton actin filaments in the Nébivolol action in EC and to evaluate the eNOS involvement in the mechanism. We found that Nébivolol increased NO production *via* a depolymerization of actin filaments during the first hour of incubation. This depolymerization resulted in the peri-nuclear translocation and the phosphorylation of the eNOS by Akt. After the first hour of incubation with Nébivolol, actin monomers were repolymerized leading to the dephosphorylation of the eNOS and the reduction in the NO production. However, it seems that the stress fibers formation is not the only mechanism required for eNOS inhibition. In fact, we have shown that eNOS translocation in the peri-membranar area, inhibited the enzyme activity after actin filaments disruption.

Key words: Nebivolol, eNOS, nitric oxide, actin cytoskeleton, endothelial cell, β blockers, shear stress.

Spécialité : Bioingénierie
Mécanique et Ingénierie cellulaire et tissulaire
Equipe LEMTA-CNRS 7563
Faculté de Médecine, Nancy-Université, BP 184, 54505 Vandoeuvre-Lès-Nancy Cedex