

# Effets du récepteur minéralocorticoïde, de l'intégrine $\alpha$v et de vimentine sur les fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires et la rigidité artérielle

Ekaterina Belozertseva

▶ **To cite this version:**

Ekaterina Belozertseva. Effets du récepteur minéralocorticoïde, de l'intégrine $\alpha$v et de vimentine sur les fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires et la rigidité artérielle. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0165 . tel-01752365

**HAL Id: tel-01752365**
**https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752365**

Submitted on 1 Dec 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.

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

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE**
**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

par

**Ekaterina BELOZERTSEVA**

# Effets du récepteur minéralocorticoïde, de l'intégrine $\alpha_v$ et de vimentine sur les fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires et la rigidité artérielle

Date de soutenance : 30 Novembre 2016

## Membres du jury :

Rapporteurs:

| | |
|---|---|
| Mme Catherine BOISSON-VIDAL | DR2 UMR_S1140, Paris |
| Mr Bijan GHALEH-MARZBAN | PU-PH UMR_S 955, Créteil |

Examinateurs:

| | |
|---|---|
| Mr Bernard LEVY | PU-PH, Université Paris VII, Paris |
| Mr Zhenlin LI | DR1, UMR 8256, UPMC, Paris |
| Mme Céline HUSELSTEIN | MCU, UMR 7365, Université de Lorraine, Nancy |
| Mr Patrick LACOLLEY | DR1, UMR_S1116, Université Lorraine Nancy<br>Directeur de thèse |
| Mme Huguette LOUIS | Docteur, UMR_S1116, Université Lorraine Nancy<br>Co-Directeur de thèse |

---

UMR_S 1116, Défaillance cardiovasculaire aigue et chronique (DCAC)
Equipe 1, Hypercoagulabilité, rigidité et vieillissement artériels

Je tiens à remercier le Dr **Patrick LACOLLEY**, qui m'a fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et pour avoir encadré mon travail de thèse, son aide scientifique et humaine qu'il m'a apporté durant ces 3 années. Je le remercie particulièrement pour tous ses conseils, sa disponibilité et pour la possibilité d'apprendre les nouvelles méthodes et approches scientifiques, pour tout ce qu'il m'a appris. Merci de votre attention, compréhension et soutien.

Je tiens à remercier également, le Dr **Véronique REGNAULT** qui m'a également fait l'honneur de m'accueillir et m'a permis de réaliser ces travaux de thèse dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour sa confiance, ses remarques, son soutien et toute son expérience scientifique partagée avec moi. Merci pour votre temps, patience et disponibilité.

Je tiens à remercier également, ma co-encadrante de thèse le Dr **Huguette LOUIS,** pour toute son aide scientifique et expérimentale pour la réalisation de mon projet de thèse. Je tiens tout particulièrement à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa patience, sa présence et tous ses conseils dans des moments très difficiles et stressants.

Je tiens à remercier le Dr **Céline HUSELSTEIN**, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en qualité de examinateur. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma sincère gratitude et de l'expression de mes remerciements.

Je tiens à remercier le Dr **Catherine BOISSON-VIDAL**, pour avoir également accepté de juger ce travail de thèse en qualité de rapporteur. Qu'elle trouve ici l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier le Pr **Bijan GHALEH-MARZBAN,** pour avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant que rapporteur. Je le remercie sincèrement pour ses conseils pour ce travail.

Je tiens à remercier très sincèrement le Pr **Bernard LEVY** qui m'a accueilli dans son laboratoire pendant mon stage de M2. Je le remercie pour son soutien, c'est en grande partie grâce à lui que j'ai pu réussir à m'intégrer dans la science française et pour m'avoir réappris la biologie cellulaire et la biochimie. Merci de m'avoir montré les joies et les difficultés de la recherche, de m'avoir fait voir les nombreuses facettes du métier de chercheur. Merci de votre temps, votre soutien et vos conseils et merci également pour l'honneur d'accepter de juger mon travail de thèse en tant que examinateur.

Je tiens à remercier sincèrement le Dr **Zhenlin LI** pour son implication sur notre travail et toute son aide scientifique et morale, pour sa disponibilité et sa grande réactivité, ses nombreuses visites à Nancy, son esprit positif et inspirant. Je voudrais lui remercier également pour avoir l'honneur de participer à ce jury en tant que examinateur.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr **Mustapha BOURHIM** pour la formation d'échotracking et myographe, pour son implication et son aide technique et moral dans ces travaux. Je voudrais saluer le soutien, l'engagement et la disponibilité dont il a fait preuve tout au long de mon doctorat et qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux de recherche.

Je remercie également le Dr **Dominique DUMAS** pour son aide irremplaçable dans les expériences de microscopie confocale qu'ont été réalisées sur la plateforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire du Biopôle BMCT FR3209 CNRS PTIBC IBISA à Nancy. Je

voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, réactivité et son esprit positif et pour tout ce qu'il m'a appris dans le domaine de microscopie du laser. Je remercie également son étudiant M1-M2 **Mohamed Ouqmara** pour son aide et explications de protocole technique.

Je tiens à remercier le Dr **Carlos LABAT** pour son soutien et sa disponibilité, la formation d'échotracking, d'études statistiques et sa bonne humeur. Merci pour toute son aide technique, statistique et humaine, pour m'avoir communiqué l'idée de la « bonne recherche » et pour m'avoir fait découvrir tout ce qu'on pouvait faire avec le logiciel Excel.

Je tiens à remercier le Dr **Benoît LANGLOIS** - merci pour tout son soutien scientifique et humaine, qu'il m'a apporté durant ma dernière année de thèse, pour ses conseils, sa disponibilité et pour tout ce qu'il m'a appris.

Je tiens à remercier le Dr **Simon THORNTON** pour toutes les corrections en anglais, pour ses nombreux conseils, sa logique et sa rapidité de relecture, qui m'a été très précieuse dans cette thèse.

Je tiens à remercier mes collègues de bureau et de travail, Dr **Jérémy LAGRANGE**, **Amel MOHAMADI** et **Chaojie WEI** pour leur aide, leur soutien et leur patience. Je tiens également à leur exprimer toute ma reconnaissance pour leur bonne humeur et esprit positif dans les moments quand je n'avais plus de moral.

Je tiens à remercier ma collègue **Véronique LAPLACE** pour toute son aide dans l'animalerie, et avoir accepté de prendre son temps pour m'aider à manipuler des animaux fragiles et faire le registre de toutes nos souris expérimentales.

Je tiens à remercier **Z'hor RAMDANE-CHERIF, Audrey ISCH, Elodie ROUSSEAU, Nathalie AUCHET MERCIER, Simon TOUPANCE, John PIRAULT, Cécile LACOMY, Anna FILIP, Delphine LAMBERT, Mélusine DIDELOT, Narimane AL KATTANI, Mark-Damien LOURENCO-RODRIGUES, Camille ROUILLON, Sophie SCHWEBEL** et tout les membres du laboratoire d'Inserm U1116 pour leurs soutiens, leurs bonnes humeurs et leurs conseils durant ces années de thèse. Merci pour tous les moments passés avec vous. Vous avez contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse, que ce soit dans le travail ou dans les moments de détente.

Je tiens à remercier Mme **Dominique MENG** d'équipe voisine CRAN pour sa grande réactivité, son aide technique et ses conseils précieux pour toutes mes expériences en histologie et immunohistochimie grâce auxquels j'ai réussi de bien avancer dans mes manipulations morphologiques.

Je tiens également à remercier le Pr **Patrick MENU**, le directeur de l'école doctorale BioSE, et ses collègues Mr **George BILLANT** et Mme **Hélène Primerano** pour tout leur soutien et aide administrative et humaine pendant ces 3 ans de thèse.

Merci beaucoup à tous les membres (anciens et actifs) de l'association des doctorants **A-Team of BioS – Antoine, Léo, Laurie, Amel, Jonathan, Daphné, Cécile, Magali**, **Yoann, Benoît, Johny, Fanny** et tous les autres - merci pour votre bonne humeur, soutien et tous les bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents **Vera** et **Alexandre,** mon mari **Sergey**, mes beaux-parents **Lyubov** et **Vyacheslav** et toute ma famille qui m'ont beaucoup soutenu et

aidé durant ces 3 ans dans toutes mes démarches, ma venue en France, mes études, mes ambitions... Merci de m'avoir aidé à faire mes études longues, merci pour tout votre amour et soutien inestimable - cette thèse est un peu la votre, elle représente pour moi la reconnaissance de votre éducation et votre aide. C'est grâce à vous j'en suis là et à qui je dois entièrement l'accomplissement de cette étape de ma vie. Je remercie également tous mes amis russes, français, algériens, chinois et beaucoup d'autres qui m'ont soutenu durant ces 3 années de thèse.

Je tiens à remercier Mr **Christian POIRSON**, le sous-directeur par interim d'Accueil doctorants internationaux de la Direction des Relations Internationales et Européennes auprès de la préfecture de l'Université de Lorraine, pour sa disponibilité, sa patience et son aide precieuse administrative et humaine pendant mes trois ans à Nancy. Merci pour votre compréhension et l'esprit encourageant.

Je voudrais enfin remercier l'**Agence Nationale de Recherche** et l**'INSERM** qui ont financé mes trois années de thèse.

*Sommaire*

**LISTE DES FIGURES** ..... **8**
**LISTE DES TABLEAUX** ..... **9**
**LISTE DES ABREVIATIONS** ..... **10**
**CONTEXTE GENERAL** ..... **13**
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE** ..... **17**
**I. Les principes de base de la rigidité artérielle** ..... **18**
**I.1.** Fonctions de conductance et d'amortissement de l'arbre vasculaire ..... **18**
**I.2.** Rigidité artérielle proximale et distale ..... **20**
**I.3.** Vitesse de l'onde de pouls ..... **21**
**I.4.** Détermination locale de la rigidité artérielle ..... **21**
**I.5.** Paramètres quantitatifs de la rigidité et d'élasticité vasculaire ..... **22**
**I.6.** Influence de la pression artérielle sur les fonctions vasculaires ..... **23**
**II. Mécanismes intrinsèques de la rigidité artérielle** ..... **24**
**II.1.** Composition de la paroi artérielle ..... **24**
**II.2.** Composants structurels de la rigidité artérielle ..... **25**
**III.** Rôle de l'intégrine $\alpha_v$ dans la rigidité artérielle ..... **34**
**III.1.** Structure et fonctions des intégrines ..... **34**
**III.2.** Impact de l'hypertension chronique et des intégrines sur le développement de la fibrose artérielle ..... **37**
**IV. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le tonus musculaire et la réactivité vasculaire** ..... **40**
**IV.1.** Rôle de la vasoréactivité dans le tonus musculaire et la rigidité artérielle ..... **40**
**IV.2.** Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les fonctions des CMLVs et réactivité vasculaire ..... **43**
**V. Rôle de la vimentine et de la synémine dans le développement de la rigidité artérielle** ..... **48**
**HYPOTHESE ET OBJECTIFS** ..... **53**
**MATERIELS ET METHODES** ..... **55**
**I. Modèles animaux expérimentaux** ..... **56**
**I.1.** Souris invalidées pour le récepteur minéralocorticoïde (MR) dans des CMLV ..... **56**
**I.2.** Souris invalidées pour la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans des CMLVs ..... **56**
**I.3.** Souris invalidées pour vimentine et synemine dans des CMLV ..... **57**
**I.4.** Conditions expérimentales ..... **58**

**II. Protocoles expérimentaux : modèle de fibrose vasculaire induite l'Ang II ..... 58**
**III. Méthodes expérimentales ..... 59**
**III.1.** Mesure de la pression artérielle chez l'animal conscient ..... **59**
**III.2.** Mesures hémodynamiques *in vivo* chez l'animal anesthésié ..... **60**
**III.3.** Echographie vasculaire ..... **62**
**III.4** Réactivité vasculaire ..... **63**
**III.5** Etudes de la structure artérielle ..... **64**
**III.6** Western Blot ..... **70**
**III.7.** Quantification de l'expression de gènes par PCR : extraction des ARN et réaction de PCR quantitative en temps réel (PCRq) ..... **71**
**III.8.** Analyse statistique ..... **71**
**RESULTATS ..... 72**
**I. Rôle du récepteur minéralocorticoïde des cellules du muscle lisse dans le tonus vasculaire ..... 73**
**II. Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans la rigidité et la fibrose vasculaire ..... 79**
**II.1.** Invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ : souris $\alpha_v^{SMKO}$ ..... **79**
**II.2.** Mesure de la pression artérielle des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ conscientes, avant et après traitement par l'Ang II ..... **79**
**II.3.** Etude de la rigidité artérielle chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ en absence et après traitement à l'Ang II ..... **80**
**II.4.** Etude de la fibrose dans la paroi artérielle des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal ou après traitement à l'Ang II ..... **85**
**II.5.** Etude des voies de signalisation de l'intégrine $\alpha_v$ chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II ..... **90**
**II.6.** Etude de la réactivité vasculaire *in vitro* chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal ou après traitement *in vivo* à l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour : contraction/relaxation des carotides isolées. ..... **91**
**III. Implication de la vimentine dans la rigidité artérielle ..... 95**
**III.1.** Expression des protéines des filaments intermédiaires dans l'artère carotide ..... **95**
**III.2.** L'invalidation de la vimentine induit une augmentation de la rigidité artérielle ..... **96**
**III.3.** Expression des composants de la membrane basale dans les souris $Vim^{-/-}$. ..... **98**
**III.4.** Modification des protéines impliquées dans les adhésions focales et des récepteurs membranaires de CMLVs des souris $Vim^{-/-}$ ..... **102**
**DISCUSSION ..... 108**
**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ..... 116**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 118**
**ANNEXE ..... 136**

# LISTE DES FIGURES

**Fig. 1.** Analyse des ondes de réflexion de la pression artérielle au cours du cycle cardiaque
**Fig. 2.** Effet "Windkessel" chez un individu sain et chez un patient hypertendu
**Fig. 3.** Mesure de VOP carotidienne-fémorale par la méthode « foot to foot » chez l'homme
**Fig. 4.** Relation entre contrainte exercée (Stress = $X_x$) et déformation de la paroi artérielle (Strain = $E_{xx}$)
**Fig. 5.** Constituants tissulaires de la paroi artérielle
**Fig. 6.** Facteurs extrinsèques et structures de la paroi artérielle qui sont impliquées dans le développement de la rigidité artérielle
**Fig. 7.** Effets des contraintes mécaniques sur les voies d'activation des intégrines
**Fig. 8.** Influence d'étirement sur le phénotype de CMLV *via* les voies de signalisation Rho/ROCK et FAK/c-Src
**Fig. 9.** Modulation phénotypique des CMLV dans l'hypertension et le vieillissement
**Fig. 10.** Phénotype des CMLV : en réponse à différents stimuli, les CMLV basculent entre le phénotype contractile et le phénotype synthétique
**Fig. 11.** La phosphorylation de FAK induite par Src est un événement crucial dans les FA qui dirige la dynamique d'adhésion, de migration, de survie et la prolifération cellulaire indépendante de leur ancrage à la MEC
**Fig. 12.** Interaction des intégrines membranaires avec la MEC
**Fig. 13.** Voies de signalisation du TGF-β.
**Fig. 14.** Rôle du MR des CMLVs dans le tonus vasculaire et la rigidité.
**Fig. 15.** Régulation de la vimentine par la protéine phosphatase1 (PP1).
**Fig. 16.** Modèle d'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans les CMLVs chez la souris adulte**.**
**Fig. 17.** Schéma des manipulations
**Fig. 18**. Schéma de la technique «tail-cuff» de mesure de la pression artérielle chez les souris éveillées, à partir de l'artère caudale.
**Fig. 19**. Schéma général d'obtention des courbes pression-diamètre par la technique d'échotracking d'artère carotidienne chez la souris.
**Fig. 20**. Schéma des différents processus de fluorescence et du genèse d'harmoniques
**Fig. 21.** Contraction vasculaire dans les aortes des souris CTL et $MR^{SMKO}$
**Fig. 22.** Relaxation vasculaire dans les aortes des souris CTL et $MR^{SMKO}$
**Fig. 23.** Invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ dans des CMLV chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$
**Fig. 24.** PAS des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ conscientes avant et après le traitement à l'Ang II
**Fig. 25.** Structure de l'artère carotide chez les souris WT et $a_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II
**Fig. 26.** Distensibilité et module élastique (courbe Einc/WS) de l'artère carotide des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II
**Fig. 27.** Détection du collagène total dans l'artère carotidienne des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II
**Fig. 28.** Détection du collagène total dans l'artère carotidienne des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II
**Fig. 29.** Immunohistochimie des marqueurs de fibrose dans l'artère carotide chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II
**Fig. 30.** Expression de taline dans les aortes des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ au niveau de base et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II
**Fig. 31.** Expression de Src, de FAK et d'Akt dans les aortes des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ au niveau de base et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II
**Fig. 32.** Réactivité vasculaire dans les carotides des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour

**Fig. 33.** Expression de la vimentine chez les souris contrôles (CTL) et invalidées pour la vimentine ($Vim^{-/-}$) dans la paroi aortique et carotidienne
**Fig. 34.** Expression des filaments intermédiaires chez les souris invalidées pour la vimentine, la synémine ou la desmine
**Fig. 35.** Distensibilité et module elastique (courbe Einc/WS) de l'artère carotide chez les souris CTL, $Vim^{-/-}$, $Syn^{-/-}$ et chez les doubles KO $Vim^{-/-}Syn^{-/-}$)
**Fig. 36.** Détection du collagène totale et de l'élastine dans l'artère carotide chez les souris CTL et $Vim^{-/-}$
**Fig. 37.** Expression des protéines de la MEC (le collagène de type 1A1, la fibronectine et la laminine) dans les aortes et les carotides chez les souris CTL et $Vim^{-/-}$
**Fig. 38.** Ultrastructure des carotides chez les souris $Vim^{+/+}$ et $Vim^{-/-}$
**Fig. 39.** Expression des recepteurs membranaires et des protéines contractiles : dans les aortes et les carotides chez les souris $Vim^{+/+}$ et $Vim^{-/-}$
**Fig. 40.** Expression des gènes et des protéines de contacts focaux, des protéines de jonctions intercellulaires et du cytosquelette dans les aortes et les carotides chez les souris CTL et $Vim^{-/-}$
**Fig. 41.** Expression de protéines de la signalisation intracellulaire FAK, Src et ERK1/2 dans les aortes chez les souris CTL et $Vim^{-/-}$

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Les AC primaires utilisés dans l'étude Western Blot

**Tableau 2.** Réactivite vasculaire dans les aortes des souris CTL et $MR^{SMKO}$

**Tableau 3.** Paramètres carotidiens mesurés chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ anesthésiées

**Tableau 4.** Marqueurs de fibrose chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$

**Tableau 5.** Réactivité vasculaire dans les carotides des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ en absence et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'AngII

**Tableau 6.** Parametres carotidiens mesurés chez les souris CTL, $Vim^{-/-}$, $Syn^{-/-}$ et $Vim^{-/-}Syn^{-/-}$

# LISTE DES ABREVIATIONS

**Ach** Acetylcholine
**ACE** Angiotensin converting enzyme
**ADN** Acide désoxyribonucléique
**AGEs** Advanced glycation end products
**AKAP** A-kinase anchoring protein
**Akt** Protein kinase B
**ALK** Activin receptor-like kinase
**AMPc** Adenosine monophosphate cyclic
**ANOVA** Analysis of variances
**Ang II** Angiotensine II
**ARN** Acide ribonucléique
**ASDN** Aldosterone-sensitive distal nephron
**AT1, AT2** Récepteur à l'angiotensine de type 1 et de type 2
**AVC** Accident vasculaire cérébral
**BKCa** Calcium-activated potassium channels of large conductance
**bFGF** basic fibroblast growth factor
**BMP** Bone morohogenetic protein
**bpm** Battements par minute
**BSA** Bovine Serum Albumin, Sérum bovin d'albumine
**CE** Cellules endothéliales
**CML/CMLV** Cellules musculaires lisses/ Cellules musculaires lisses vasculaires
**$CO_2$** Dioxyde de carbone
**COX** Cyclo-oxygénase
**CPI-17** Protein kinase C-potentiated inhibitory protein 17 kDa
**CRP** C-reactive protein
**DAB** 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
**DD** Diamètre diastolique
**DS** Diamètre systolique
**ΔP** Variation de pression intraluminale
**Δt** Délai de transmission de l'onde de pouls entre les deux sites de mesure
**ΔV** Variation de volume
**EDHF** Endothelium-derived hyperpolarizing factor
**EDTA** Acide éthylène-diamine-tétraacétique
**ECA** Enzyme de conversion de l'angiotensine
**EGFR** Epidermal growth factor receptor
**Einc** Module élastique incrémentiel
**EMT** Epithelial-mesenchymal transition
**eNOS** endothelial NOS
**ERK** Extracellular signal-regulated kinase, early response kinase
**ET-1** Endothelin-1
**FA/FAs** Focal adhesion/Focal adhesion site
**FAK** Focal adhesion kinase, kinase d'adhésion focale
**FC** Fréquence cardiaque
**FGF** Fibroblast growth factor, facteur de croissance des fibroblastes
**GCs** Guanylate cyclase soluble
**GFAP** Glial fibrillary acidic protein
**GMPc** Guanosine mono-phosphate cyclique
**GPCR** G-protein coupled receptor
**HERP1** HES-bound repressor protein-1
**$H_2O_2$** Hydrogen peroxide

**IC** Insuffisance cardiaque
**ICAM-1** InterCellular Adhesion Molecule-1, Molécule 1 d'adhérence intercellulaire
**IF** Intermediate filaments
**IL** Interleukine
**Indo** Indométacine
**ITM** Intima-media thickness
**iNOS** inducible NOS
**IP** Récepteur aux prostacyclines
**IP3** Inositol triphosphate
**IP3R** Récepteur de l'IP3
**iPS** Inductible pluripotent stem cells
**JNK** c-Jun/NH2-terminal kinase
**KI** Knock-in
**KLF4/5** Krupple-like factor-4/5
**KO** Knock-out
**LAP** Latency associated peptide
**LCSA** Lumen cross sectional area, la surface de coupe transversale de la lumière vasculaire
**L-NAME** Nω-nitro-L-arginine methyl ester
**L-NNA** Nω-nitro-L-arginine
**LTCC** L-type $Ca^{2+}$ channel or voltage-dependent calcium channel
**MAP/MAPK** Mitogen-activated protein/mitogen-activated protein kinases
**MCSA** Medial cross-sectional area, La surface de coupe transversale médiale
**MEC** Matrice extracellulaire
**MHC** Myosin heavy chain, Chaîne lourde de la myosine
**miR** MicroARN, micro acide ribonucléique
**MLC/ MLCK** Myosin light chain/myosin light chain kinase, kinase de chaîne légère de myosine
**MLCP** Myosin light chain phosphatase
**MMP** Métalloprotéinase matricielle
**MR** Mineralocorticoid receptor, Récepteur minéralocorticoïde
**MRA** Mineralocorticoid receptor antagonists
**MYPT1** Myosin phosphatase target subunit 1
**NADPH** Nicotinamide adénine dinuclétide phosphate
**NFκB** Nuclear factor kappa B
**nNOS** neuronal NOS
**NO** Azote Monoxyde
**NOS** NO synthase
**OMTC** Optical magnetic twisting cytometry
**PA** Pression artérielle
**PAD** Pression artérielle diastolique
**PAI-1** Plasminogen activator inhibitor-1
**PAK** Protein kinase A
**PAM** Pression artérielle moyenne
**PAR-1** Protease activated receptor-1**,** Récepteur 1 activé par les protéases
**PAS** Pression artérielle systolique
**PBS** Phosphate buffered saline : solution saline tamponnée à pH 7,4-7,6
**PCR** Polymerase chain reaction : réaction en chaîne par polymérase
**PDGF** Platelet-derived growth factor, facteur de croissance dérivé de plaquettes
**PDGFR** Récepteur au PDGF
**PG** Prostaglandine
**PGI2** Prostacycline
**Phe** Phenylephrine

**PI3K** Phosphoinositol 3 kinase
**PKB/Akt** Phosphokinase B/Akt
**PKG** Protein kinase cGMP-dependant
**PP** Pression pulse
**PP1** Protein phosphatase type 1
**PPARγ** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
**PWV** Pulse Wave Velocity
**RGD** Séquence tripeptide Arg-Gly-Asp
**RhoA** Homologue A des gènes de la famille Ras
**ROCK** Rho-associated protein kinase
**ROI** Region of Interest, Région d'intérêt
**ROS** Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène
**SERCA2** Sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase
**SMMHC** Smooth muscle myosin heavy chain
**SNP** Nitroprussiate de sodium
**SRF** Serum responce factor, facteur de réponse au sérum
**Src** Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
**TAK** – TGF-β-activated kinase, kinase activée par TGF-β
**TBS/TBST** Solution Tris Buffer/ Solution Tris Buffer + Tween
**TIMP** Tissue inhibitor of metalloproteinases
**TGF-β** Facteur de croissance transformant β
**TP** Récepteur aux thromboxanes
**TXA2** Thromboxane A2
**VAMs** Vimentin associated matrix adhesions
**VCAM-1** Vascular Cell Adhesion Molecule-1, Molécule 1 d'adhérence vasculaire
**VEGF** Vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
**VOP** Vitesse d'onde de pouls
**WIF-1** Wnt inhibitory factor 1
**Wnt** Wingless integration site
**WS (Wall Stress)** Contrainte circonférentielle de cisaillement

# CONTEXTE GENERAL

La rigidité artérielle a une valeur prédictive des événements cardiovasculaires (CV), indépendamment des autres facteurs de risque (Zieman *et al*. 2005 Mitchell *et al*. 2010 ; Safar *et al*. 2011). Elle est responsable de l'hypertension artérielle systolique du sujet âgé dont la prévalence dépasse 60% (Benetos *et al*. 2002 ; Avolio *et al*. 2009). Aucun médicament anti-hypertenseur n'a véritablement démontré son efficacité directe sur la rigidité indépendamment de son action hypotensive, soulignant l'importance d'identifier de nouveaux mécanismes (Zieman *et al*. 2005). La rigidité artérielle est également responsable de l'hypertrophie ventriculaire gauche et de l'augmentation de la pression pulsée (PP) qui sont aussi des déterminants majeurs de l'insuffisance cardiaque (Laurent *et al*. 2006 ; Mancia *et al*. 2007).

Les altérations de la rigidité artérielle ne peuvent être attribuées aux seules modifications du niveau de pression et/ou aux contenus en élastine et collagène. D'autres déterminants comme les attachements des cellules musculaires lisses (CMLV) de la paroi artérielle à la matrice extracellulaire (MEC), les récepteurs des CMLV (notamment le récepteur mineralocorticoide et les intégrines), les contacts d'adhésion focaux, les radicaux libres et la fonction endothéliale pourraient être impliqués (Zieman *et al*. 2005, Mercier *et al*. 2006 ; Louis *et al*. 2007 ; Safar et Lacolley 2009, Hoffman *et al*. 2011 ; Mao *et al*. 2012 ; Galmiche *et al*. 2014).

Les attachements cellules-matrice et la structure interne de la MEC sont des éléments déterminants de la rigidité et la composante musculaire (CMLV) exerce un rôle clé dans l'organisation des constituants de la paroi. Il est considéré qu'une augmentation du nombre de liaisons et de leur sollicitation accroît la rigidité du matériau évaluée par le module élastique incrémentiel (Einc). Au niveau de la paroi, le nombre de points d'attachements fonctionnels pourrait être réglé, au moins en partie, par le degré d'activation des CMLV. Leur contraction augmente le recrutement des systèmes de liaisons conduisant à la rigidification de la paroi. La rigidité et l'hypertension artérielle sont associées avec le remodelage vasculaire, l'hypertrophie cardiaque et la fibrose. La fibrose induit des lésions chroniques avec la perturbation de l'architecture tissulaire, le dysfonctionnement et l'insuffisance éventuelle des organes. Par conséquent, le développement de thérapies anti-fibrotiques efficaces est indispensable.

Le but principal a été d'analyser les relations entre les fonctions des CMLVs et le remodelage vasculaire : la répartition des structures d'attachement entre les CMLV et la MEC, l'activation des intégrines et des molécules intracellulaires présentes dans ces structures et leur rôle dans le développement de la fibrose vasculaire et la rigidité artérielle.

**La première partie** de ce travail présente l'état des lieux actuel des données bibliographiques concernant la rigidité vasculaire, ses déterminants et ses conséquences ainsi que l'influence de différents facteurs (les récepteurs membranaires, les composants du cytosquelette des CMLV et de la MEC) sur les fonctions des CMLV et le développement de la rigidité artérielle. Les différents modèles animaux disponibles pour les études expérimentales (développés dans notre laboratoire ou utilisés en collaboration) y sont également détaillés, afin de justifier leur intérêt et leur valeur pour la compréhension des mécanismes de la rigidité artérielle.

Dans **une seconde partie** seront présentées les études expérimentales réalisées au cours de cette thèse.

Une première étude avait pour but d'étudier le rôle du récepteur minéralocorticoïde (MR) des CMLV sur la réactivité vasculaire et le développement de la rigidité artérielle. Plusieurs auteurs ont rapporté l'importance de ce récepteur sur les fonctions des CMLV et des CE, le tonus myogénique et les propriétés élastiques des vaisseaux et des fonctions de CMLV (Takeda 2009 ; Funder et Mihailidou 2009 ; Schäfer *et al*. 2013 ; Barrett *et al*. 2013 ; Funder 2013). Pour cette étude nous avons utilisé le modèle murin avec une invalidation constitutive du MR dans les CMLV (McCurley *et al*. 2012 ; Galmiche *et al*. 2014).

Une seconde étude a permis de définir le phénotype de rigidité vasculaire dans des conditions physiologiques et pathologiques et évaluer l'impact de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur les fonctions des CMLV dans le modèle murin avec une invalidation conditionnelle de la sous-unité $\alpha_v$ dans les CMLV. Des travaux antérieurs ont montré le rôle des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_1\beta_1$ dans les propriétés mécaniques artérielles (Bézie et al. 1998 ; Louis et al. 2007 ; Turner et al. 2015). La formation des structures d'adhésion focales passe également par un mécanisme $\alpha_v\beta_3$-dépendant (Romer et al. 2006 ; Sun Z et al. 2008). Des données bibliographiques montrent que l'invalidation de l'intégrine $\alpha_v$ peut avoir des conséquences délétères au niveau de la structure vasculaire et de l'hémostase (Lacy-Hulbert et al. 2007) mais aussi bénéfiques pour le développement de la fibrose tissulaire dans des organes cibles comme le foie, le rein et le poumon (Munger et al. 1999 ; Annes et al. 2002 ; Jenkins et al. 2006 ; Hahm et al. 2007 ; Farris et Colvin 2012 ; Henderson et al. 2013, Madala et al. 2013). Notre hypothèse de travail était que l'invalidation de sous-unité $\alpha_v$ pourrait avoir des effets protecteurs au cours du développement de la rigidité et de la fibrose artérielle.

Une troisième étude avait pour objectif d'analyser le phénotype de la souris déficiente pour les protéines - composantes des filaments intermédiaires cellulaires (vimentine et synémine) dans les CMLV : nous avons étudié les changements des structures d'adhésions focales et de la structure interne du cytosquelette, et leur influence sur la rigidité vasculaire.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. Les principes de base de la rigidité artérielle

L'augmentation de la rigidité artérielle est une caractéristique du processus de vieillissement et la conséquence de nombreux états pathologiques tels que le diabète, l'athérosclérose et l'insuffisance rénale chronique. Il y a des marqueurs cliniques de la rigidité vasculaire tels que la pression pulsée (PP) et l'hypertension systolique isolée. La rigidité artérielle et les ondes de réflexion de la pression artérielle (PA) sont des facteurs qui influencent la PP et la pression artérielle systolique (PAS). La pression artérielle diastolique (PAD) a aussi une influence importante sur la rigidité vasculaire (Hermeling *et al*. 2010) et sa diminution jusqu'à des valeurs faibles (le phénomène "courbe J") chez les patients hypertendus est également reconnue comme le facteur de risque de maladies CV (Safar *et al*. 2011 ; Kang et Wang, 2016). Ces données physiopathologiques et épidémiologiques justifient une stratégie « anti-rigidité » pour diminuer le risque cardiovasculaire (Laurent *et al*. 2006 ; Safar *et al*. 2011).

## I.1. Fonctions de conductance et d'amortissement de l'arbre vasculaire

Deux composantes de la pression artérielle (PA) peuvent être distinguées : une composante stable et un composant pulsatile. La première est exprimée par la pression artérielle moyenne (PAM) qui se définit par le produit entre le débit cardiaque et la résistance vasculaire et peut être mesurée comme PAM = PAD+0,4xPP (Bos *et al*. 2007 ; Avolio *et al*. 2009). C'est un paramètre qui reflète le calibre des petites artères. L'autre composante peut être exprimée par la PP, calculée comme PAS-PAD. La PP centrale est déterminée par le débit sanguin systolique, les ondes de réflexions de la pression artérielle et la rigidité artérielle. Les ondes de réflexions se divisent en onde incidente (éjectée) et en onde réfléchie, les sites de réflexion se situant en aval au niveau du lit artériolaire. En situation normale chez le sujet jeune, l'onde réfléchie intervient en diastole et ne modifie pas la pression artérielle systolique. Au cours du vieillissement quand des vaisseaux deviennent plus rigides, elle intervient plus tôt (la période du temps - Tr sur la Figure 1 devient plus court) en systole et se juxtapose à l'onde incidente entraînant une majoration de la pression artérielle systolique (delta P sur la figure = AP). Cette augmentation de pression est quantifiée par l'index d'augmentation défini comme le rapport entre la partie delta P et la pression pulsée totale. En raison de la cinétique des ondes de réflexion qui dépend du site artériel, l'amplitude de la pression pulsée est plus élevée en périphérie du système artériel. Ce gradient d'augmentation de la pression pulsée normalement observée entre les artères centrales et périphérique disparaît chez le sujet âgé ou hypertendu avec augmentation de la rigidité artérielle (Figure 1).

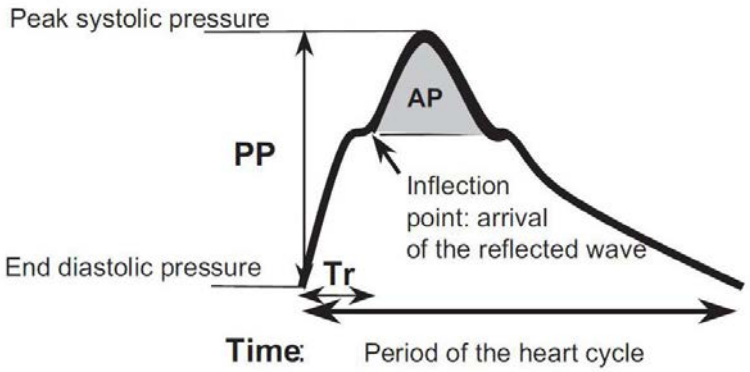
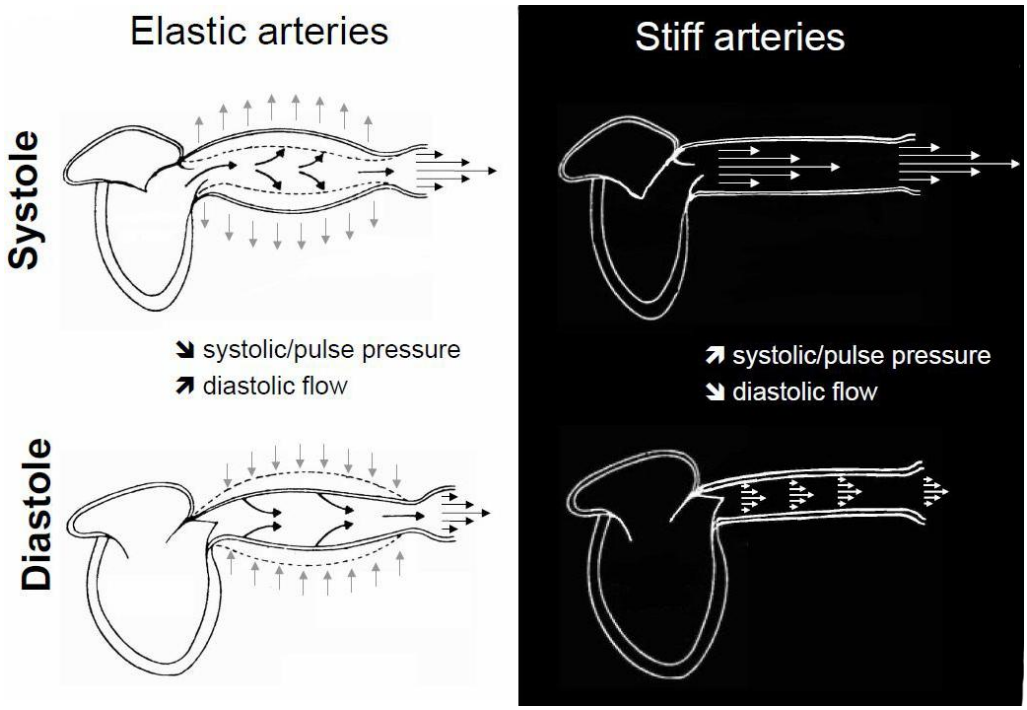



**Fig. 1. Analyse des ondes de réflexion de la pression artérielle au cours du cycle cardiaque :** AP – augmentation de la PAS égale la somme de l'onde de pression incidente et de l'onde réfléchie de la paroi vasculaire rigide, Tr – la période du temps (sec) entre le début de l'onde incidente et l'arrivée de l'onde réfléchie, PP – la pression pulsée qui augmente à cause de l'onde réfléchie (Avolio *et al*. 2009).

La PAM et la PP sont deux facteurs indépendants prédictifs d'évènements CV. Ces 2 paramètres sont des modulateurs importants de la structure, la géométrie et des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire (Eberth *et al*. 2010). Alors que PAM prédit le risque global de CV (y compris l'insuffisance cardiaque), la PP prédit les complications liées à l'athérosclérose, principalement des artères coronaires. La PP contribue à l'effet "Windkessel" qui est la capacité des gros troncs artériels à transformer le flux sanguin pulsatile provenant du cœur en flux constant au niveau périphérique, fournissant ainsi une oxygénation optimale des tissus. Dans le modèle Windkessel de la compliance artérielle, les artères élastiques se comportent comme un réservoir du sang stocké en systole pour être restituer en diastole en périphérie. (Sehgel *et al*. 2015). Ce modèle distingue ainsi les fonctions de «conductance» et «d'amortissement» de l'arbre artériel et sert à illustrer les changements observés dans l'hypertension artérielle : une augmentation des résistances périphériques totales et une diminution de la compliance artérielle. Si seules les résistances sont élevées, la PAM augmente avec une augmentation proportionnelle de PAS et PAD. Cependant, en présence d'une réduction de la compliance artérielle, la PAM augmente avec la PP. (Figure 2).

Au cours du développement de l'hypertension artérielle les vaisseaux perdent leurs propriétés élastiques et la compliance diminue. La rigidification des artères conduit à une augmentation de la post-charge de ventricule gauche responsable d'une hypertrophie ventriculaire et d'une diminution de la capacité de perfusion myocardique. L'augmentation de la rigidité artérielle et une plus grande résistance à l'écoulement dans les organes cibles (le cerveau et les reins) exposent les petits vaisseaux à un gradient de pression pulsée plus élevée conduisant à des complications vasculaires comme les AVC au niveau cérébral. Au niveau

rénal l'exposition artériolaire à des niveaux de PP plus élevés explique les lésions microvasculaires favorisant la survenue d'une insuffisance rénale (O'Rourke et Safar 2005).




**A** **B**

**Fig. 2. Effet "Windkessel" chez un individu sain et chez un patient hypertendu : A** - effet "Windkessel" chez un individu sain. Les vaisseaux élastiques en systole stockent une partie du sang éjecté pour ensuite la restituer pendant la diastole. Cela permet d'amortir la pulsation artérielle entre le cœur et les vaisseaux en gardant un débit continu en périphérie ; **B** - chez un patient hypertendu le retour plus rapide des ondes réfléchies augmente le gradient de pression pulsée en périphérie (d'après P. Boutouyrie, 2012).

### I.2. Rigidité artérielle proximale et distale

Les propriétés élastiques des artères varient selon leur localisation au niveau de l'arbre artériel: les artères proximales sont plus élastiques et les artères distales plus rigides. Cette hétérogénéité est expliquée par la structure moléculaire, cellulaire et histologique de la paroi artérielle (O'Rourke et Hashimoto 2007) variable dans les différentes parties de l'arbre artériel. Donc les gros troncs artériels et les vaisseaux périphériques répondent différemment au vieillissement, à l'hypertension et au traitement. Par conséquent, les ondes de la pression ont une amplitude et un contour différent dans des artères centrales et périphériques (O'Rourke *et al*. 2002).

### I.3. Vitesse de l'onde de pouls

La mesure de la vitesse de propagation de l'onde de pression artérielle tout au long de l'aorte est appelée vitesse de l'onde de pouls. Elle est le paramètre de référence de la rigidité artérielle en recherche clinique et épidémiologique. Chez les sujets jeunes avec les vaisseaux sont plus distensibles, la VOP est plus lente par rapport aux personnes âgées. La VOP peut augmente considérablement avec l'âge et est considérée comme un prédicteur indépendant du risque CV (O'Rourke *et al*. 2002 ; Safar *et al*. 2011). La méthode directe et non invasive est la mesure de la VOP carotidienne (sur la carotide commune) et fémorale (sur l'artère fémorale commune) - Figure 3. Chez un individu sain, la VOP entre l'artère carotide et fémorale est de 3 à 5 m/s (Laurent *et al*. 2006).

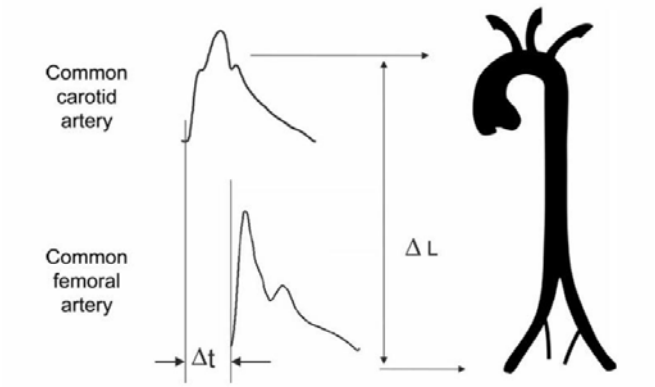



**Fig. 3. Mesure de VOP carotidienne-fémorale par la méthode « foot to foot » chez l'homme :** VOP (m/s) = Longueur (ΔL)/temps de propagation (Δt) (Laurent *et al*. 2006).

### I.4. Détermination locale de la rigidité artérielle

La rigidité artérielle locale des artères relativement superficielles peut être déterminée en utilisant des méthodes à ultrasons. La rigidité carotidienne a un intérêt particulier puisque les lésions d'athérosclérose y sont fréquentes. Tous les types de systèmes d'échographie vasculaire bi-dimensionnelle peuvent être utilisés pour déterminer des changements du diamètre interne de l'artère. Mais la plupart de ces techniques sont limités dans la précision des mesures car ils utilisent généralement une analyse de vidéo-image. La plupart des études physiopathologiques et pharmacologiques utilisent des techniques d'échotracking. Un avantage majeur est que la rigidité artérielle locale est déterminée directement à partir des mesures des variations systolo-diastoliques du diamètre artériel. Elles sont couplées avec les variations de pression pulsée simultanées. L'échographie est actuellement le seul moyen chez l'homme de déterminer de manière non invasive l'épaisseur de la paroi artérielle et les propriétés élastiques du matériau de la paroi artérielle (module élastique de Young). Les

différents paramètres quantitatifs obtenus par échotracking (compliance, distensibilité et module élastique) artérielle sont utilisés pour décrire les propriétés élastiques des vaisseaux.

### I.5. Paramètres quantitatifs de la rigidité et d'élasticité vasculaire

La compliance artérielle est un rapport de la variation absolue du volume (ΔV) pour une variation de la pression artérielle (ΔP) et est mesurée par l'équation : $C = \Delta V/\Delta P$ en ml/mmHg (O'Rourke *et al*. 2002).

La distensibilité artérielle est définie par les variations relatives du volume artériel ou de la surface intraluminale (LCSA - lumen cross-sectional area, $LCSA = \pi D^2/4$ où D – diamètre intraluminale) sur les variations de pression. Elle est exprimée par l'équation $\Delta V/V \times \Delta P$ ou $(1/LCSA) \times (\Delta LCSA/\Delta P)$ en $mmHg^{-1} \cdot 10^{-3}$ (Labat *et al*. 2001 ; Lacolley *et al*. 2001).

L'élasticité est la propriété physique que possède un matériau de se déformer sous l'effet d'une force ou d'une contrainte, puis de reprendre sa forme initiale lorsque la force cesse de s'exercer. La déformation d'un corps purement élastique est instantanée et proportionnelle à la contrainte $\sigma = F/S$ où F est la force agissant sur une surface S (loi de Hooke). Les propriétés élastiques du matériau de la paroi artérielle peuvent être étudiées grâce à des courbes contrainte/déformation. Le rapport entre la contrainte appliquée (pression) et la déformation (étirement pariétal) permet de définir un indice d'élasticité - le module élastique de Young (Nichols *et al*. 2011). Il représente une constante caractéristique d'un matériau : plus la valeur de ce module élastique est élevée, plus le matériau est rigide. Cependant, la paroi artérielle ayant une composition hétérogène, son comportement n'est pas élastique mais visco-élastique et la relation contrainte-déformation n'est pas linéaire (O'Rourke *et al*. 2002 ; Laurent *et al*. 2006). Il est alors définit un module élastique incrémentiel (Einc) qui correspond à la tangente en chaque point de la relation non-linéaire contrainte-déformation. Le calcul de Einc nécessite la mesure de l'épaisseur de la paroi artérielle (Laurent *et al*. 2006). La relation contrainte/déformation est linéaire au niveau des contraintes les plus faibles (point a sur la Figure 4) où l'Einc est égal au module élastique de Young (Figure 4).

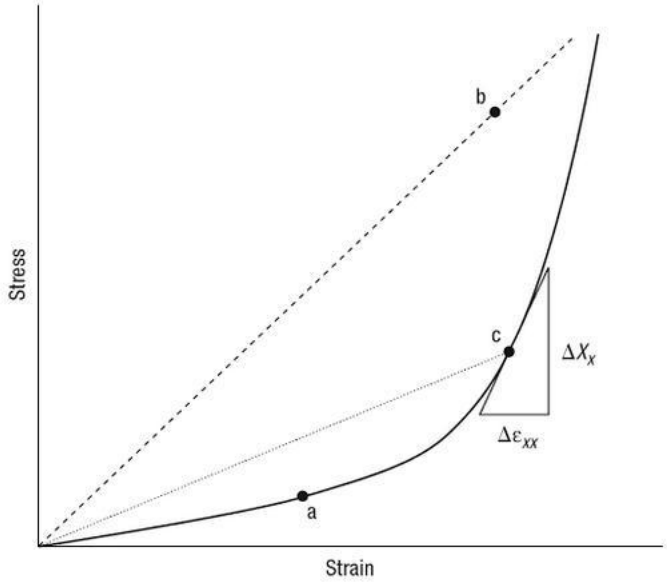



**Fig. 4. Relation entre contrainte exercée (Stress = $X_x$) et déformation de la paroi artérielle (Strain = $E_{xx}$) :** la relation linéaire (ligne pointillée) est applicable dans les points a et b. Dans le point C cette relation est et non linéaire (ligne continue), donc le module élastique (qui représente la pente de la courbe en point C) est calculé comme la tangente de relation linéaire en point C : Einc = $X_x/E_{xx}$ (Nichols *et al*. 2011).

La distensibilié exprime le comportement élastique global d'artère, et le module élastique exprime des propriétés élastiques intrinsèques du matériel de la paroi vasculaire (Bézie *et al*. 1998).

**I.6. Influence de la pression artérielle sur** les fonctions vasculaires

Des études montrent au niveau d'une PA basse ou normale le module élastique de l'élastine est dominant sur le comportement mécanique et que la paroi vasculaire est relativement extensible. A un niveau de PA plus élevée, le module élastique du collagène est dominant et la paroi est relativement inextensible : moins de 10% des fibres de collagène sont engagées à pression basse. A un niveau de pression plus élevé l'artère devient progressivement moins distensible car les fibres de collagène sont recrutées pour supporter une sollicitation mécanique plus élevée et ainsi limiter la distension aortique (Safar *et al*. 2011). La compliance et la distensibilité artérielle diminuent passivement avec l'augmentation de la PA : ce phénomène doit être distingué des changements actifs structurels conduisant à la diminution de la compliance de la paroi artérielle. Par ailleurs la nature non linéaire de l'élasticité vasculaire est cruciale : un changement de module élastique pour un changement

de pression intra-artérielle est plus élevé à PA haute qu'à PA basse. Ainsi, l'augmentation de PA conduit à une augmentation importante de la VOP.

La présence de contraintes mécaniques est nécessaire à la maturation de la paroi artérielle et à la différenciation des CMLV. Cela conditionne les propriétés essentielles des CMLV qui sont la migration, la prolifération et la synthèse des protéines de la MEC. Le développement de la rigidité des gros troncs artériels est une manifestation principale de l'hypertension artérielle. La rigidité artérielle est un caractère principal du remodelage vasculaire hypertensif (Zieman *et al*. 2005 ; Hoffman *et al*. 2011). Les changements structurels qui contribuent à une augmentation de la rigidité artérielle comprennent la fragmentation de l'élastine, l'augmentation des dépôts de collagène, les calcifications artérielles et les « cross-links » des molécules d'élastine et de collagène par les produits avancés de glycation (AGEs). Au cours du vieillissement les AGEs sont responsables de la signalisation du stress oxydant par l'augmentation de l'expression de NF-κB, des radicaux libres, des cytokines proinflammatoires, des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion. Ces médiateurs augmentent la rigidité et le tonus vasculaire, induisent le développement de la dysfonction endothéliale avec la diminution de la vasodilatation et la formation de la fibrose vasculaire et des plaques athérosclérotiques (Zieman *et al*. 2005).

## II. Mécanismes intrinsèques de la rigidité artérielle

### II.1. Composition de la paroi artérielle

La paroi artérielle est constituée de plusieurs tuniques disposées de manière concentrique de la cavité endoluminale vers la périphérie de l'artère. Ces tuniques sont l'intima, la media et l'adventice :

- l'intima (tunique interne), est en contact direct avec le flux sanguin et est composée de l'endothélium et de la lame limitante élastique interne. L'endothélium est responsable de la libération des substances vasoactives régulant le tonus vasomoteur et la réactivité vasculaire.

- la média (tunique moyenne) se trouve entre les lames limitantes élastiques interne et externe. Elle détermine des propriétés élastiques de la paroi et contient principalement des CMLV et une MEC composée d'élastine, de collagène, de glycoprotéines, de protéoglycanes et de fibronectine (Zieman *et al*. 2005). La média des artères élastiques de gros calibre contient des faisceaux musculo-élastiques : chaque faisceau est composé de CMLV regroupées et de fibres de collagène qui sont délimités par des fibres d'élastine orientées vers l'axe principal des CMLV. Cette construction permet une distribution équilibrée des contraintes mécaniques dans la paroi vasculaire. Les éléments constitutifs de la média sont

caractérisés chacun par un module élastique différent : il existe des éléments à faible module élastique (élastine, CMLV) et des éléments à fort module élastique (collagène).

- l'adventice (tunique externe), composée de fibres de collagène principalement, assure la liaison avec des tissus conjonctifs adjacents (Figure 5). Elle joue un rôle important dans l'élasticité de la paroi pour des niveaux de pression élevés et dans la résistance à la rupture, par exemple dans le cas des anévrysmes (Martufi et Gasser 2011). Les molécules du collagène ont une forme fibrillaire et elles sont les plus abondantes dans l'adventice et confèrent à la paroi sa résistance aux contraintes mécaniques. Elles sont sécrétées localement par les fibroblastes (Martufi et Gasser 2012). L'adventice est traversée de *vasa vasorum*, de vaisseaux lymphatiques et de structures nerveuses et joue un rôle dans l'apport nutritionnel de la paroi artérielle. Le réseau lymphatique adventitiel assure l'évacuation des substances provenant du sang et transportées à travers la paroi. Les nerfs de la paroi contribuent aussi au contrôle du calibre vasculaire et du tonus myogenique et promeuvent une contraction et une relaxation des petites artères par action directe sur les CMLV de la media (Tedgui et Lévy 1994).

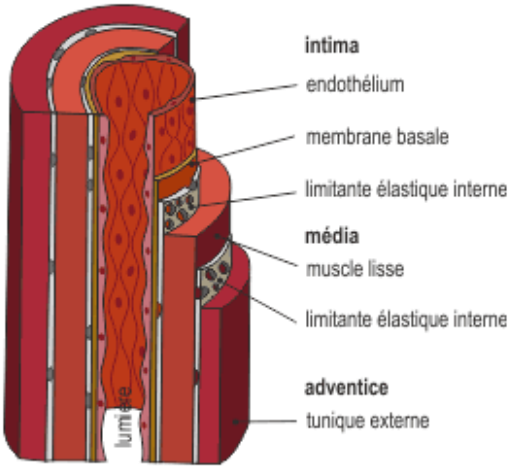



**Fig. 5. Constituants tissulaires de la paroi artérielle.**

## II.2. Composants structurels de la rigidité artérielle

### *II.2.1. La matrice extracellulaire et ses constituants principaux : le collagène et l'élastine*

Les fibres d'élastine des lames élastiques sont composées de fibrilles d'épaisseur de 0,1-0,2 µm qui construisent le réseau de microfibrilles. Ces microfibrilles jouent un rôle dans la distribution uniforme des forces mécaniques dans les tissus (Ushiki *et al*. 2002). Les grandes artères sont constamment exposées aux distensions cycliques et l'élastine fournit une

capacité élastique importante permettant de propulser le sang circulant pendant la diastole (Eberth *et al*., 2010).

Les molécules de collagène ont une structure hélicoïdale - hélices de polyproline type II qui sont stabilisées par les acides aminées (proline et hydroxyproline) en quantité élevée. Les hélices s'organisent en trois chaînes (30-100 nm d'épaisseur). Ces trois chaînes s'assemblent à une fibrille de diamètre 1-20 µm qui forme avec d'autres fibrilles des ensembles supramoléculaires dans l'espace extracellulaire. Après leur formation, les molécules de collagène sont immédiatement liées, pontées entre elles (hydroxylation enzymatique post-translationnelle) afin de les rendre résistantes aux enzymes hydrolytiques. Les fibres de collagène sont très peu extensibles mais leur organisation en réseau les rend relativement flexibles. Dans la MEC, les collagènes de types I, II et III sont les plus présents (Comper 1996). Les molécules du type I sont des fibrilles fines et flexibles de longueur 300 nm en contraste avec les fibrilles du procollagène qui possède le propeptide C-terminale globulaire et N-terminale vague (Ushiki *et al*. 2002). Le collagène fibrillaire promeut une rigidité nécessaire qui protège les CMLV de la surextension aiguë pendant l'augmentation de la pression et donc préserve la contractilité (Eberth *et al*. 2010).

À cause de son taux de renouvellement lent, le collagène est particulièrement sensible à la glycation non enzymatique par les AGEs. Cela conduit à une augmentation du contenu en collagène avec des fibres désorganisées et dysfonctionnelles qui forment des structures plus rigides. Il y a un équilibre du ratio collagène/élastine dans la média, et une augmentation de ce rapport, induit par l'hypertension, conduit à une surproduction de collagène anormal et à une diminution de l'élastine normale, ce qui contribue à la rigidité vasculaire (Xu *et al*. 2000).

Les CE, les CMLV et les fibroblastes sont sensibles aux changements des contraintes mécaniques et modifient l'organisation, la synthèse et la dégradation des protéines contenues dans la MEC (Lehoux et Tedgui 2003 ; Ebert *et al*. 2010). L'analyse histologique de l'intima des vaisseaux rigides révèle des CE anormales, une augmentation du collagène, des molécules d'élastine effilochées et brisées et une l'infiltration par de macrophages et des cellules mononucléées (Zieman *et al*. 2005) – Figure 6.

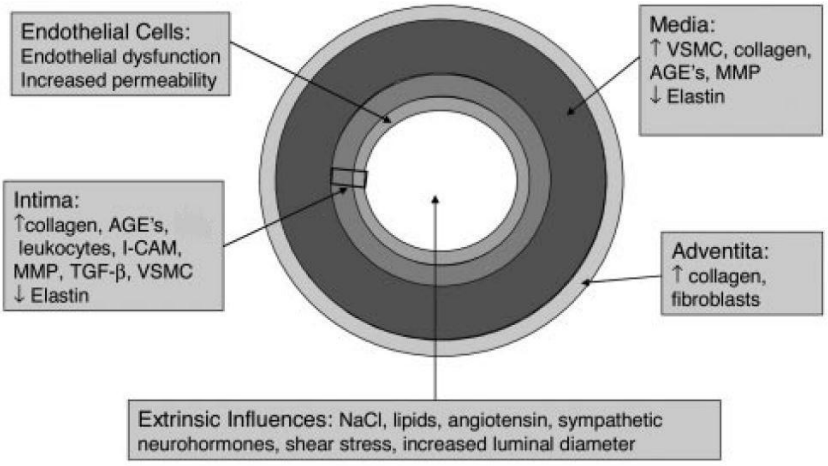



**Fig. 6. Facteurs extrinsèques et structures de la paroi artérielle qui sont impliquées dans le développement de la rigidité artérielle** (Zieman *et al*. 2005).

L'hypertension artérielle induit une augmentation de la contrainte circonférentielle, ce qui entraîne une hypertrophie des CMLV et la réduction de la lumière vasculaire. Ce remodelage est une façon d'adapter la paroi à la contrainte mécanique (Lehoux et Tedgui 2003). L'hypertrophie des CMLV de la média s'accompagne souvent de l'accumulation de matériels fibreux liée à l'altération de l'endothélium qui devient perméable aux macromolécules plasmatiques. Les CMLV augmentent leur capacité prolifération et sécrétoire. Cette prolifération anormale est liée à une production accrue de facteurs de croissance (PDGF, TGF-β), une diminution de la synthèse des facteurs anti-prolifératifs et est associée à l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines dans la paroi artérielle.

### *II.2.2. Structure et fonctions de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV)*

Les CMLV sont le composant cellulaire principal de la média artérielle. Elles expriment des protéines contractiles, des canaux ioniques et des molécules de signalisation qui régulent la PA par la modulation du tonus vasculaire. Contrairement à la majorité des cellules différenciées, les CMLV ont une plasticité importante qui leur permet de modifier leur phénotype normal contractile vers un phénotype dédifférencié (synthétique) en réponse à des signaux extracellulaires (Michel *et al*. 2012). Le phénotype différencié est caractérisé par l'expression des protéines contractiles matures et un taux faible de prolifération, de migration et une absence de synthèse de MEC. En revanche, les CMLV dédifférenciées ont des taux de prolifération, de migration et de production de protéines de la MEC augmentés, et une diminution des protéines contractiles adultes (Davis-Dusenbery *et al*., 2011). Au cours du

développement les CMLV produisent la MEC et sont également impliquées dans la réparation des artères (la formation de la néo-intima) après des lésions de l'endothélium (Regan *et al*. 2000). Elles participent au remodelage vasculaire en contrôlant la production (synthèse du collagène et d'élastine) et la dégradation (synthèse des métalloprotéases matricielles - MMP) de la MEC (Kanda *et al*. 2000 ; Michel *et al*. 2012).

Différents facteurs peuvent influencer la prolifération, la différenciation et l'apoptose des CMLV : les interactions avec les CE et la MEC ainsi que les facteurs mécaniques et hémodynamiques (Wernig *et al*. 2003 ; Su *et al*. 2006). Les CMLV des vaisseaux de résistance maintiennent un tonus contractile myogénique basal qui est responsable de la régulation de la PA et la redistribution du flux sanguin généré par le coeur. Les CMLV sont très sensibles aux contraintes mécaniques et peuvent activer de nombreuses voies de signalisation et des mécanorécepteurs : par exemple les récepteurs à tyrosine kinases (Src), les intégrines, les canaux ioniques ($Ca^{2+}$ canaux de type L), les récepteurs des protéines G et le récepteur de PDGF (Haga *et al*. 2007 ; Sun *et al*. 2008). Lorsqu'une force mécanique est appliquée, elle induit une activation de la protéine kinase C et des MAP kinases ce qui conduit à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription (c-fos, Sp1, Egr1), des molécules de signalisation (JNK, voie SAPK/JNK, P38, ERK) et des protéines du cytosquelette (caldesmone, SMMHC – smooth muscle myosin heavy chain) (Chapman *et al*. 2000 ; Mack *et al*. 2001 ; Cheng *et al*. 2007 ; Albinson et Hellstrand 2007 ; Qu *et al*. 2007). L'activation des récepteurs intégrines agit sur les voies FAK et Src et induit leur phosphorylation qui est essentielle pour la polymérisation de l'actine (Halka *et al*. 2008) - Figure 7.

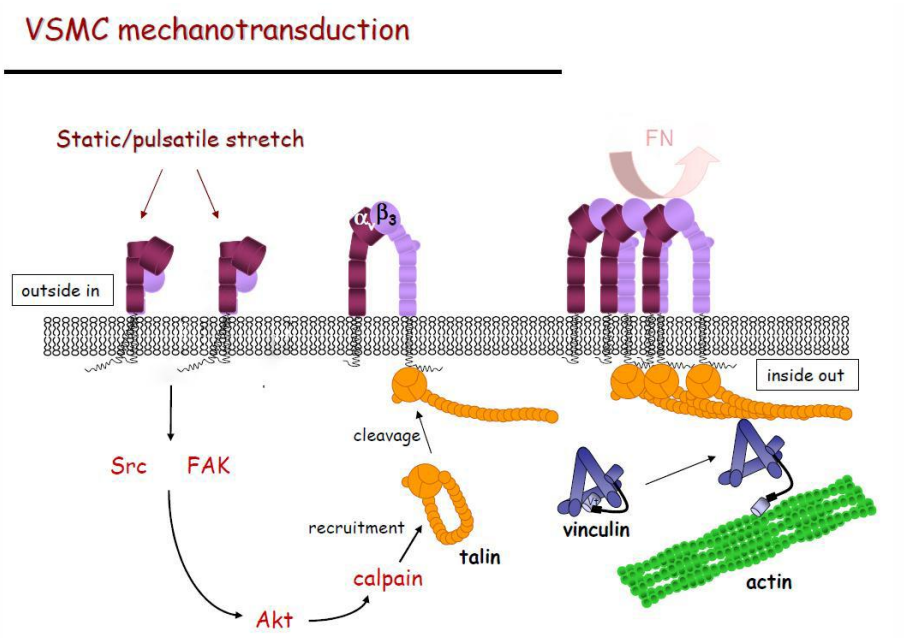



**Fig. 7. Effets des contraintes mécaniques sur les voies d'activation des intégrines :** des contraintes statiques ou pulsées induisent une activation de l'intégrines membranaires ce qui se traduit *via* la phosphorylation des protéines de voies FAK et Src. FAK et Src activées induisent (*via* la voie Akt et l'activation de calpaïne) le clivage de taline et sa liaison à la partie cytoplasmique de la sous-unité β (la signalisation « outside-in »). Cette liaison induit le changement conformationnel de deux sous-unités α et β d'intégrine en ouvrant son site actif ce qui permet l'interaction avec un de ses ligands – fibronectine (FN). L'interaction « ligand-récepteur » induit une augmentation des liaisons de taline aux domaines cytoplasmiques d'intégrines ce qui promeut la polymérisation d'actine (d'après Lacolley *et al*. 2012).

L'étirement cyclique joue également un rôle essentiel dans la modulation phénotypique des CMLV par l'activation de la voie Rho/ROCK via des adhésions focales sur la surface cellulaire ce qui permet la polymérisation des filaments d'actine. Ce processus est essentiel pour assurer le couplage excitation-contraction. La différenciation des CMLV nécessite également des facteurs de transcription, en premier lieu le complexe SRF-CAGR-myocardine. Il permet l'expression de nombreux gènes marqueurs spécifiques de la différenciation des CMLV comme la SM22α (le marqueur de cellules musculaires lisses adultes), la calponine, l'α-SMA (α-smooth muscle actin), la SMMHC, la smootheline, la desmine et la h-caldesmone (« heavy chain of caldesmon ») (Mack *et al*. 2001 ; Owens *et al*. 2004 ; Hellstrand et Albinsson 2005) – Figure 8. L'α-SMA est une isoforme spécifique de fibres de stress pour CMLV et c'est le composant le plus abondant (70% de l'actine totale) dans la CMLV. Il est également la structure centrale de mécano-sensation, -transduction et -transmission cellulaire (Qiu *et al*. 2010).

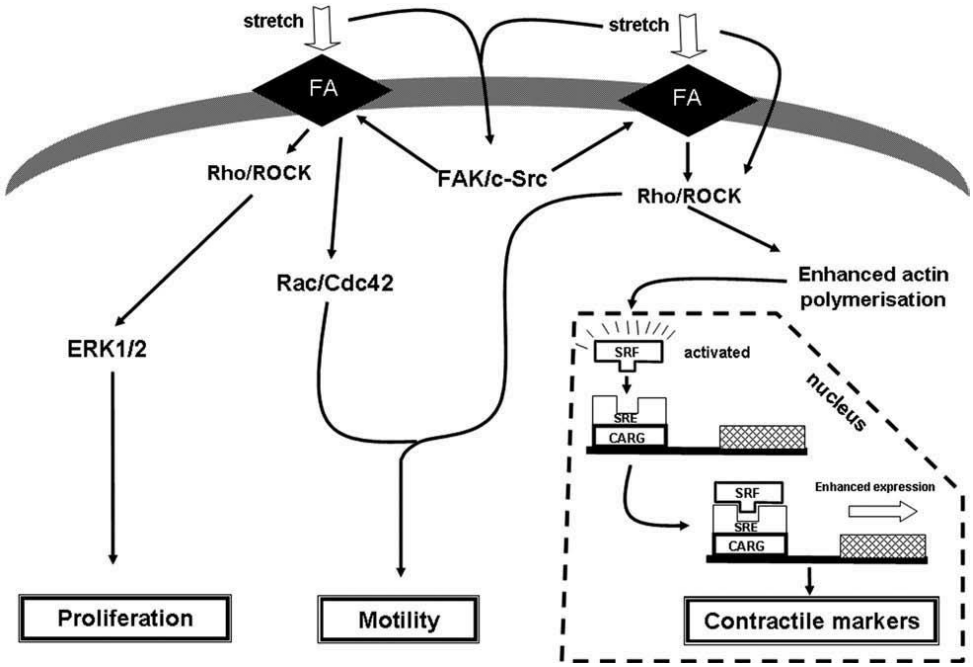



**Fig. 8. Influence d'étirement sur le phénotype de CMLV *via* les voies de signalisation Rho/ROCK et FAK/c-Src.** La force mécanique induit l'activation des adhésions focales (FA) ce qui promeut l'activation de Rho/ROCK et soit l'augmentation de a prolifération cellulaire (*via* la voie ERK1/2) soit la polymérisation d'actine avec une stimulation consécutive d'expression des marqueurs contractiles (Halka *et al*. 2008).

La stimulation des CMLV par des facteurs de croissance conduit à une perte de contractilité et leur transition vers un phénotype synthétique (Shaw et Xu 2003 ; Lacolley *et al*. 2012). Par la voie de signalisation intégrine-Src, l'étirement cyclique peut induire la prolifération des CMLV via l'activation des MAP kinases telle que ERK1/2. La phosphorylation de FAK et de la voie PI3K sont aussi impliquées (Albinson et Hellstrand 2007). La voie Notch coopère avec la signalisation du PDGF et du TGF-β pour réguler la migration et la différenciation des CMLV. Le PDGF et le TGF-β sont des médiateurs clés du changement phénotypique des CMLV : le PDGF est impliqué dans la répression active de l'expression des gènes spécifiques des CMLV, alors que le TGF-β favorise le phénotype contractile. Le facteur d'inhibition-1 de Wnt (Wingless integration site WIF-1 ou Wnt inhibitory factor 1) ralentit la prolifération des CMLV induite par le PDGF – Figure 9.

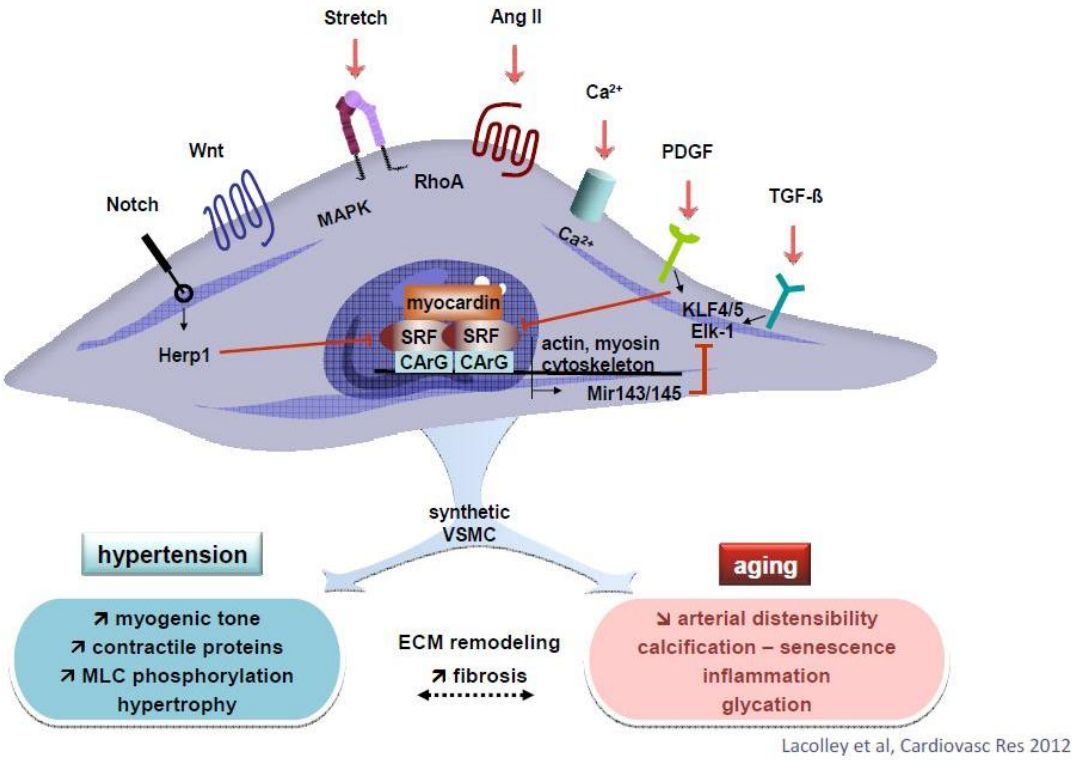



**Fig. 9. Modulation phénotypique des CMLV dans l'hypertension et le vieillissement.** L'axe CArG-SRF-myocardine joue un rôle central dans le maintien de l'état contractile. Son activité est modulée par Notch, Wnt, le PDGF et le TGF-β et aussi par des facteurs de répresseur tels que Herp1, Klf4/5 et Elk1. Un phénotype synthétique peut résulter d'une augmentation de l'Ang II, du $Ca^{2+}$ intracellulaire ou de l'étirement par l'activation de voies de signalisation spécifiques. La distensibilité artérielle diminue avec l'âge mais pas dans l'hypertension, ce qui est associé avec le maintien de la fonction artérielle (Lacolley *et al*. 2012).

### *II.2.3. miRs et leur influence sur la différentiation des CMLV*

Les microARN (miARN) sont les ARN non-codantes courtes (21-24 nucléotides) qui régulent l'expression post-transcriptionnelle des ARN messagers (mARN). Grâce à la régulation de leurs mARN codantes miARN contrôlent des aspects divers de la biologie tels que le développement, la différenciation, la prolifération, le métabolisme et la mort cellulaire. Ainsi, les miARN jouent un rôle essentiel dans la détermination de la physiologie cellulaire normale et misexpression des miARN conduit à des réponses pathologiques (Davis-Dusenbery et Hata, 2011).

Les miRs régulent également de manière dynamique la différenciation des CMLV: les miR-143/145, miR-21 et miR-1 induisent un phénotype contractile, alors que les miR-221, miR-146a, miR-24 et miR-26a sont impliqués dans la de-différentiation caractérisé par un phénotype synthétique et prolifératif (Davis-Dusenbery *et al*. 2011). La plasticité des CMLV joue un rôle important dans le genèse de l'hypertension : le changement de phénotype nécessite une configuration spécifique des facteurs de transcription et l'expression des miRs.

Il a été montré que les souris avec l'invalidation de miR-143 et miR-145 ont une réduction significative de la pression artérielle (Xin *et al*. 2009). Il a été proposé que les miRs 143/145 sont activés dans les voies parallèles de Jagged-1/Notch et SRF/myocardine (coactivateur de SRF cardiaque/CMLV-sélective) (Cordes *et al*. 2009). Les miRs 143/145 sont des cibles directes de SRF et de la myocardin, qui à leur tour deviennent des cibles d'un réseau de facteurs de transcription tels que Krupple-like factor-4 (KLF4) et ETS-like factor-1 transcription (Elk-1) (Alexander, Owens 2012). Chez les jeunes patients hypertendus, l'expression du récepteur AT1R de l'Ang II est corrélée négativement avec le miR-155, qui ne reconnaît que l'allèle A du gène d'AT1R. Il a également été rapporté que KLF4/5, Elk-1, HES-lié répresseur protéine-1 (Herp1), FoxO4, et la sous-unité p65 de NFκB inhibent l'expression des gènes spécifiques des CMLV et médient les effets du PDGF-BB, du TGF-β et la signalisation de la voie Notch dans des CMLV favorisant ainsi l'état synthétique de CMLV (Alexander et Owens, 2012). Les miRs sont extrêmement importants pour la régulation d'hypertrophie, remodelage et la fibrose cardiaque et vasculaire. Les miRs 143/145a sont responsables d'hypertrophie musculaire vasculaire et cardiaque et de maintenance du phénotype contractile de CMLV, la famille de miR34 (miR34a-b) est impliquée dans le développement de la fibrose en induisant la voie Smad4/TGF-β1 (Maegdefessel *et al*. 2015 ; Huang *et al*. 2014) – Figure 10.

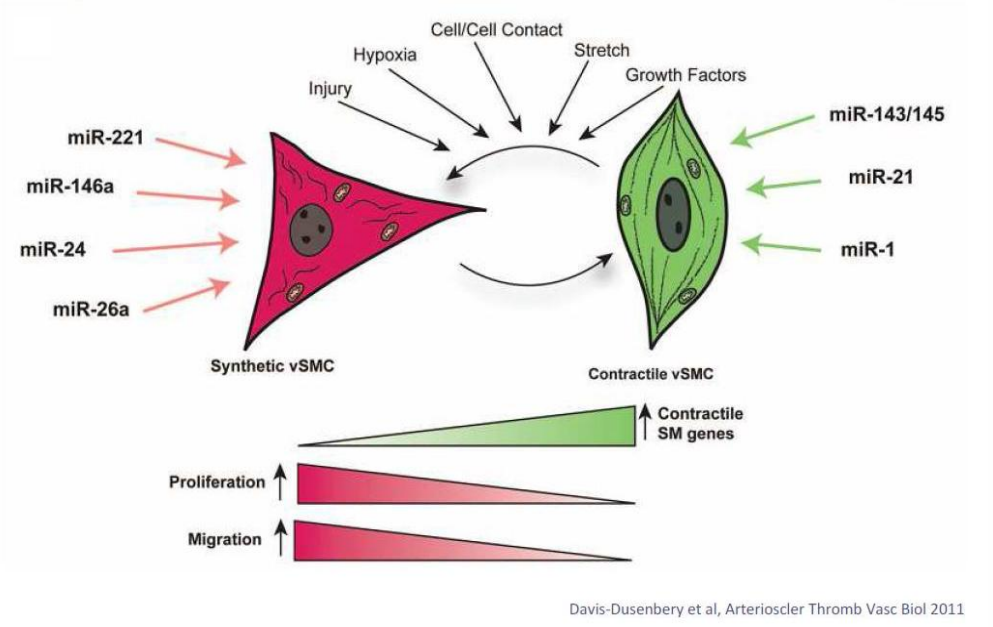



**Fig. 10. Phénotype des CMLV : En réponse à différents stimuli, les CMLV basculent entre le phénotype contractile et le phénotype synthétique.** Le phénotype contractile est caractérisé par une forte expression de gènes contractiles et une diminution des gènes de la prolifération et la migration. A l'inverse, les CMLV dans un phénotype synthétique expriment de faibles niveaux de gènes contractiles matures et des taux de prolifération et de migration augmentés (d'après Davis-Dusenbery *et al*. 2011).

### *II.2.4. Adhésions focales et leur rôle dans les interactions CMLV- MEC*

La rigidité aortique accrue est une caractéristique importante de nombreuses pathologies vasculaires (le vieillissement, l'hypertension, l'athérosclérose, les anévrismes aortiques etc.). Elle se traduit par des changements dans la MEC (augmentation de contenu du collagène et diminution de contenu d'élastine), également par des changements intrinsèques des CMLV. La notion de rigidité cellulaire a été décrite par le groupe de Meininger *et al*. (Qiu *et al*. 2010 ; Sehgel *et al*. 2015). La rigidité des CMLV est fortement réduite après le désassemblage du cytosquelette d'actine ou l'inhibition de la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK). Ces données suggèrent que l'augmentation de la rigidité vasculaire est au moins en partie attribuable aux changements des propriétés intrinsèques des CMLV (Meininger 2014).

Les adhésions focales (FA) sont des ponts moléculaires entre les espaces intra- et extracellulaires qui intègrent une variété de stimuli environnementaux spécifiques complexe de plusieurs protéines. Elles sont des structures majeures pour la coordination précise et efficace de la signalisation bidirectionnelle entre CMLV et la MEC. Leur activation répond le plus souvent à des interactions ligands-récepteurs. Quatre facteurs principaux influencent le taux d'assemblage, la taille et l'impact fonctionnel des FA : les propriétés biophysiques et biochimiques de la MEC, l'activation des intégrines, l'état contractile du cytosquelette et l'environnement cellulaire et tissulaire (Romer *et al*. 2006). Les FA associées à des intégrines fournissent non seulement des liaisons adhésives entre l'actine intracellulaire et la MEC, mais elles sont également les sites de transmission des signaux vers l'intérieur de la cellule. Des nombreuses réponses cellulaires sont effectuées par FAK (souvent *via* son autophosphorylation induite par l'interaction des ligands avec les intégrines) ou par la phosphorylation des kinases de la famille Src. La phosphorylation à médiée par Src ou FAK agit comme un régulateur d'actine, des adhésions et de la signalisation de survie, ce qui, à son tour, contrôle la migration et la prolifération cellulaire. Cela montre que la régulation dynamique d'actine et des FA (y compris les intégrines) est essentielle pour les réponses biologiques cellulaires (Westhoff *et al*. 2004) – Figure 11.

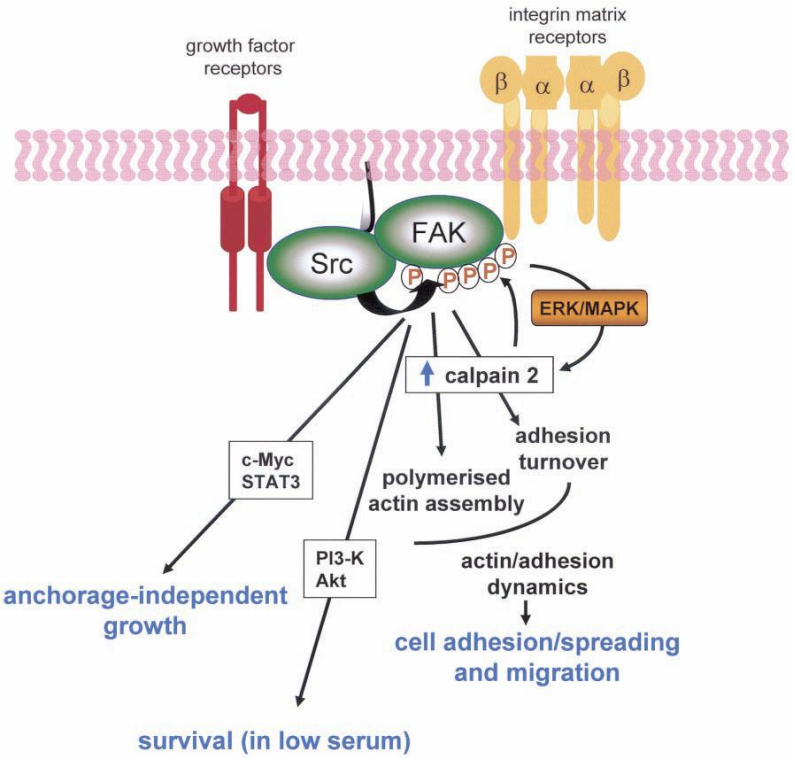



**Fig. 11. La phosphorylation de FAK induite par Src est un événement crucial dans les FA qui dirige la dynamique d'adhésion, de migration, de survie et la prolifération cellulaire indépendante de leur ancrage à la MEC.** Cette phosphorylation est nécessaire pour assemblage rapide des fibres de stress d'actine et pour la formation de FA qui favorisent l'adhésion initiale, l'étalement et la migration cellulaire. Ces processus sont partiellement médiés par la calpaïne2 qui est appliquée à la régulation des voies ERK/MAPK. La phosphorylation de FAK induite par Src implique l'activation de PI3-K/Akt, STAT3 et c-Myc et promeut la survie et la prolifération indépendante de l'ancrage des cellules transformées (tumorales), en remplaçant des signaux intégrine-dépendants (Westhoff *et al*. 2004).

## III. Rôle de l'intégrine $\alpha_v$ dans la rigidité artérielle

### III.1. Structure et fonctions des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire hétérodimériques constitués de deux sous-unités liées de façon non covalente. Les domaines clés des intégrines sont la région extracellulaire de liaison au ligand, le segment extracellulaire proximal de la membrane, le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique. Les intégrines sont formées par l'association de sous-unités α et β et composées d'une « tête » bilobulaire et de deux « jambes » qui traversent la membrane plasmatique (Van Agthoven *et al*. 2014). Il existe 18 sous-unités α- et 8 sous-unités β qui se combinent pour former plus de 24 paires d'intégrines différentes (Xiao *et al*. 2007). La sous-unité $\alpha_v$ est la sous-unité la plus présente : elle peut être associée avec cinq sous-unités β différentes ($\beta_1$, $\beta_3$, $\beta_5$, $\beta_6$ et $\beta_8$). Les intégrines participent à de nombreux processus cellulaires tels que la migration cellulaire, la survie et la signalisation

des facteurs de croissance ainsi que les adhésions cellule-cellule et cellule-matrice *via* des interactions étroitement régulées par leurs ligands. Elles peuvent reconnaître des séquences peptidiques spécifiques parmi lesquelles la séquence Gly-Asp-Arg (RGD) (Xiong *et al*. 2002, Zhou *et al*. 2006).

La liaison des intégrines avec leurs ligands induit une signalisation "outside-in" qui se traduit par des réarrangements structuraux dans l'ectodomaine des intégrines. Ces réarrangements favorisent le remodelage du cytosquelette des CMLVs *via* des connexions entre les queues cytoplasmiques de l'intégrine et des filaments d'actine. Des stimuli physiologiques réagissent avec les queues cytoplasmiques intracellulaires des intégrines et induisent des changements allostériques dans l'ectodomaine qui sont nécessaires pour la liaison avec un ligand extracellulaire (activation "inside-out") – Figure 12. Les intégrines sont extrêmement importantes dans la physiologie des CMLVs : elles couplent la MEC au cytosquelette, assurant ainsi une liaison mécanique entre les CMLV et l'environnement extracellulaire. La sous-unité $\alpha_v$ est fortement exprimée dans les CMLVs et elle est impliquée dans le contrôle de l'adhésion cellulaire, la migration, la différenciation/dédifférenciation, la contractilité, la prolifération et l'apoptose (Bunni *et al*. 2010;. Kappert *et al*. 2001; Turner *et al*. 2015).

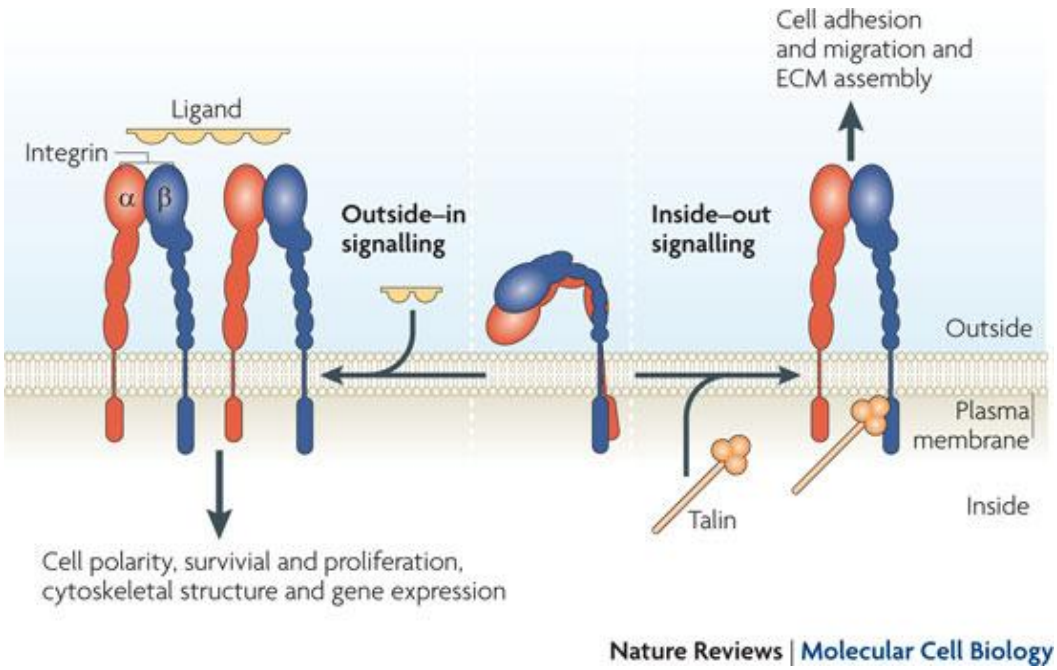



**Fig. 12. Interaction des intégrines membranaires avec la MEC :** au centre – l'état inactif de l'intégrine ; à gauche – le couplage avec un ligand spécifique de la MEC initie le signal "outside-in" et changement conformationnel des sous-unités d'intégrine ; à droite – l'interaction entre la taline et domaine intracellulaire de l'integrine β induit un signal "inside-out".

Les sous-unités $\alpha_v$ sont largement exprimées dans de nombreux tissus au cours du développement et elles participent à la règulation du système immunitaire, de l'inflammation et de la dégradation des cellules apoptotiques (Lacy-Hulbert *et al*. 2007).

La famille de l'intégrine $\beta_3$ contient l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est spécifique des plaquettes et les mégacaryocytes et elle joue un rôle essentiel dans l'hémostase. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est exprimée sur la surface de nombreux types cellulaires, tels que des ostéoclastes, des CMLVs, des cellules endothéliales et des cellules tumorales (Zhou *et al*. 2006). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ participe à l'angiogenèse, la formation néointimale après des lésions vasculaires et au trafic leucocytaire (Stouffer et Smyth, 2003). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur pour un grand nombre de protéines de la MEC. Parmi ses ligands il y a la vitronectine, la fibronectine, la thrombospondine, le collagène protéolysé, le facteur von Willebrand et l'ostéopontine, mais aussi le fibrinogène, la prothrombine, (Eliceiri et Cheresh 1999; Li *et al*. 2010).

L'inactivation conditionnelle de la sous-unité $\alpha_v$ dans des CMLVs chez la souris a montré que la présence de cette intégrine est très importante pour le remodelage du cœur et des grands troncs vasculaires au cours du développement (Van der Flier *et al*. 2010). Il a été montré que le collagène de type VI en association avec les sous-unités $\alpha_v$, $\alpha_1$ et $\beta_1$ participe à la différenciation des cellules souches embryonnaires à les CMLVs par le récepteur β du PDGF *via* des voies de signalisation FAK/paxilline-PI3-kinase-MEK-ERK/JNK (Xiao *et al*. 2007).

L'analyse des CMLVs en culture déficientes en sous-unités $\alpha_5/\alpha_v$ a montré que ces cellules n'adhérent pas à la fibronectine et à la vitronectine et une adhérence réduite à la laminine et au collagène de type I. La perte des sous-unités $\alpha_v$ et $\alpha_5$ perturbe la formation d'adhésions focales et la signalisation cellulaire : les CMLV avec une invalidation d'intégrines $\alpha_v$ et $\alpha_5$ présentent une forte réduction de l'activation de la voie FAK/PTK2 et du taux de phosphorylation de paxilline et de p130 (substrat Crk-associé - CAS). Les CMLVs déficientes en sous-unités $\alpha_5/\alpha_v$ ont également un défaut de signalisation du TGF-β (Turner *et al*. 2015), qui est un médiateur principal du développement de la fibrose dans plusieurs organes. Les souris invalidées pour l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ développent une inflammation exagérée mais elles sont protégées contre la fibrose pulmonaire (Munger *et al*. 1999).

Pour étudier le rôle de l'intégrine $\alpha_v$ dans les CMLVs, un modèle de souris transgéniques a été créé. Les souris KO totales (constitutives) pour la sous-unité $\alpha_v$ meurent en milieu de gestation, de déficiences placentaires ou immédiatement après la naissance à cause d'hémorragies cérébrales et intestinales et de fente palatine (Lacy-Hulbert *et al*. 2007).

Le rôle important de la sous-unité $\alpha_v$ dans la réparation des lésions tissulaires, dans l'inflammation et dans les réponses immunitaires a été demontré dans le travail de Dr. Hynes (Hynes 2002). La mortalité des souris $\alpha_v^{-/-}$ est principalement attribuable à la perte d'$\alpha_v\beta_8$ dans les tissus parenchymateux des vaisseaux sanguins (McCarty *et al*. 2005), parce que les souris $\beta_8^{-/-}$ montrent les mêmes anomalies de la vascularisation neuronale et placentaire (Zhu *et al*. 2002).

Il a été montré que certaines intégrines, tels que $\alpha_1$, $\alpha_5$, et $a_v$ peuvent réguler les propriétés mécaniques de la paroi artérielle par des changements phénotypiques des CMLVs et des altérations d'interaction entre les CMLVs et la MEC (Kakou *et al*. 2009 ; Louis *et al*. 2007 ; Galmiche *et al*. 2013 ; Heerkens *et al*. 2006). Une augmentation du nombre des adhésions focales induit une augmentation de la rigidité de paroi vasculaire (Galmiche *et al*. 2013 ; Heerkens *et al*. 2006). Une augmentation d'expression des intégrines $\alpha_5\beta_1$ ou $\alpha_v\beta_3$ peut moduler l'adaptation fonctionnelle et le remodelage des grosses artères, ce qui indique que les intégrines jouent également un rôle important dans la régulation de l'élasticité artérielle (Intengan et Schiffrin 2000). Les travaux précédents de notre équipe ont montré que l'application de contraintes mécaniques cycliques sur des cultures des CMLVs induit une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de l'expression de ses voies de signalisation. En parallèle, deux fonctions des CMLVs sont modifiées - l'adhésion cellulaire à la MEC et le genèse de thrombine (Mao *et al*. 2012). Il a été également montré qu'une inactivation des composants du cytosquelette ou de structures d'adhésions focales des CMLVs telles que la desmine ou l'intégrine $\beta_1$ peut modifier la rigidité artérielle (Lacolley *et al*. 2001 ; Louis *et al*. 2007). Ces résultats démontrent l'influence importante des intégrines sur les fonctions des CMLVs et sur la rigidité artérielle.

### III.2. Impact de l'hypertension chronique et des intégrines sur le développement de la fibrose artérielle

Des lésions chroniques tissulaires induisent le développement de la fibrose qui conduit à la perturbation de l'architecture tissulaire, au dysfonctionnement des organes et à l'insuffisance éventuelle des organes. La fibrose représente une pathologie clinique majeure dont les options thérapeutiques actuellement disponibles sont très limitées. Dans la plupart des cas, la transplantation d'organes est le seul traitement efficace pour la fibrose au stade terminal. Cependant, la disponibilité limitée des organes de donneurs, le coût de l'intervention et les co-morbidités chez les receveurs montrent que la transplantation d'organes ne peut être proposée qu'à un petit nombre de patients ayant une fibrose. Le développement de thérapies anti-fibrotiques efficaces reste donc un défi pour l'amélioration du traitement des patients.

La fibrogenèse implique une interaction complexe entre les différentes composants de la cicatrisation : l'inflammation, l'épithélium, les myofibroblastes et la MEC (Henderson et Iredale 2007 ; Varga et Abraham 2007). La MEC péricellulaire représente un environnement très dynamique qui a une influence extrêmement importante sur les cellules. Les intégrines sont intimement impliquées dans l'initiation, la maintenance et la résolution de la fibrose tissulaire par la communication de cellules inflammatoires, de fibroblastes et de cellules parenchymateuses et la MEC (Conroy *et al*. 2016).

Parmi leurs effets directs sur la prolifération et la survie cellulaire, les intégrines peuvent potentialiser les signaux provenant de facteurs de croissance. Il a été montré que les sous-unités $\alpha_{v,}$ $\beta_1$ et $\beta_3$ sont impliquées dans le remodelage hypertensif eutrophique des artères de résistance chez le rat TGR (mRen2) 27. Cette action est possible grâce à l'assemblage nécessaire des protéines de la MEC contenant le motif RGD et à l'incorporation et l'activation de la forme latente du TGF-β (Heerkens *et al*. 2006).

Le TGF-β1 est un acteur principal dans le développement de la fibrose inflammatoire chronique. Le TGF-β1 participe à la régulation des fonctions des intégrines dans les CMLVs et dans les CEs (Graf *et al*. 2000). Les CMLVs répondent au TGF-β1 par une augmentation de la synthèse de la MEC : une régulation positive des protéoglycanes, de la fibronectine et la synthèse du collagène survient en parallèle d'une régulation négative des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 et une activation de TIMP-1. Le TGF-β1 joue un rôle important dans la médiation des effets de l'Ang II sur la MEC, le remodelage vasculaire et le développement de la fibrose. L'activation du TGF-β1 par l'Ang II est dépendante des ROS créés par la NADP (H) oxydase et est couplée à plusieurs signaux des voies de transduction telles que la voie MAP kinase et la voie Smad. Les modifications pharmacologiques des voies Smad/TGF- β1 sont donc des cibles potentielles pour la thérapie antifibrotique (Zieman *et al*. 2005).

Le TGF-β est sécrété sous forme d'un complexe latent lié directement à la MEC qui existe à des concentrations élevées. Une grande partie de la régulation des fonctions du TGF-β dans les tissus est basée sur l'activation extracellulaire de son complexe latent. Deux des trois isoformes du TGF-β chez les mammifères (TGF- β1 et 3) peuvent être activées par des membres de la famille des intégrines qui interagissent avec un motif RGD linéaire dans un fragment amino-terminal du TGF-β : le peptide latent associé - LAP (Turner *et al*. 2015). L'inhibition et le blocage des intégrines $\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_v\beta_8$ miment tous les effets de la perte de TGF-β1 et 3, ce qui suggère que ces deux intégrines sont nécessaires pour la plupart des fonctions importantes du TGF-β (Henderson *et al*. 2013).

Des études ont montré que le TGF-β1 et l'Ang II sont des facteurs cruciaux pour le remodelage cardiaque (Graf *et al*. 2000) et vasculaire (Louis *et al*. 2007) et pour la réparation tissulaire : l'Ang II induit une augmentation de l'expression de la fibronectine, la laminine, et le mARN du TGF-β1 *via* son récepteur membranaire spécifique AT1 dans des fibroblastes cardiaques (Graf *et al*. 2000). L'Ang II est également un agent mitogène puissant pour les CMLVs (Bunni *et al*. 2010) : ses effets passent par le récepteur AT1 qui est impliqué dans la réponse hypertrophique de la paroi vasculaire *via* des MAP kinases (ERK1/2, JNK et p38 MAPK) et FAK (Albinson et Hellstrand 2007) - Figure 13.

Les membres de la famille du TGF-β induisent leurs effets cellulaires en activant les complexes hétérotétramériques des récepteurs transmembranaires de type I et II de la sérine-thréonine kinase. Il y a sept récepteurs de type I et cinq récepteurs de type II qui sont appelés « activin receptor-like kinases » (ALK). Les signaux du TGF-β dans la plupart des cellules se réalisent *via* le récepteur spécifique du TGF-β de type I (TGF-β1/TGF-βR1/ALK5) et de type II (TGFBR2), les activines (ALK4) et le BMP *via* le récepteur spécifique du BMP de type II (BMPR2) et ALK1, 2, 3 et 6 (Heldin *et al*. 1997 ; Schmierer et Hill 2007 ; ten Dijke et Arthur 2007). Les protéines Smad sont des médiateurs intracellulaires de la famille TGF-β et elles sont classés en trois groupes : les protéines régulées par le récepteur (R-Smad), les médiateurs communes (Co-Smad), et les protéines inhibitrices (I-Smad) (Heldin *et al*. 1997 ; Schmierer et Hill 2007). Lors de l'activation, le TGF-βR1 recrue et phosphoryle le R-Smad à deux résidus de la sérine dans leur C-termini extrêmes. Les ALK4, 5 et 7 induisent la phosphorylation de R-Smad 2 et 3, tandis que les ALK1, 2, 3 et 6 induisent la phosphorylation de R-Smad 1, 5 et 8. Les R-Smad activés interagissent avec la Smad 4 et se déplacent dans le noyau où elles régulent l'expression des gènes cibles. Les I-Smads (Smad 6 et 7) peuvent inhiber l'activation de R-Smads par la compétition avec les R-Smads pour le TGF-βR1 et en recrutant des ligases spécifiques d'ubiquitine ou des phosphatases, ciblant le complexe du récepteur activé pour sa dégradation par le protéasomes ou par la déphosphorylation (Pardali *et al*. 2010) - Figure 13.

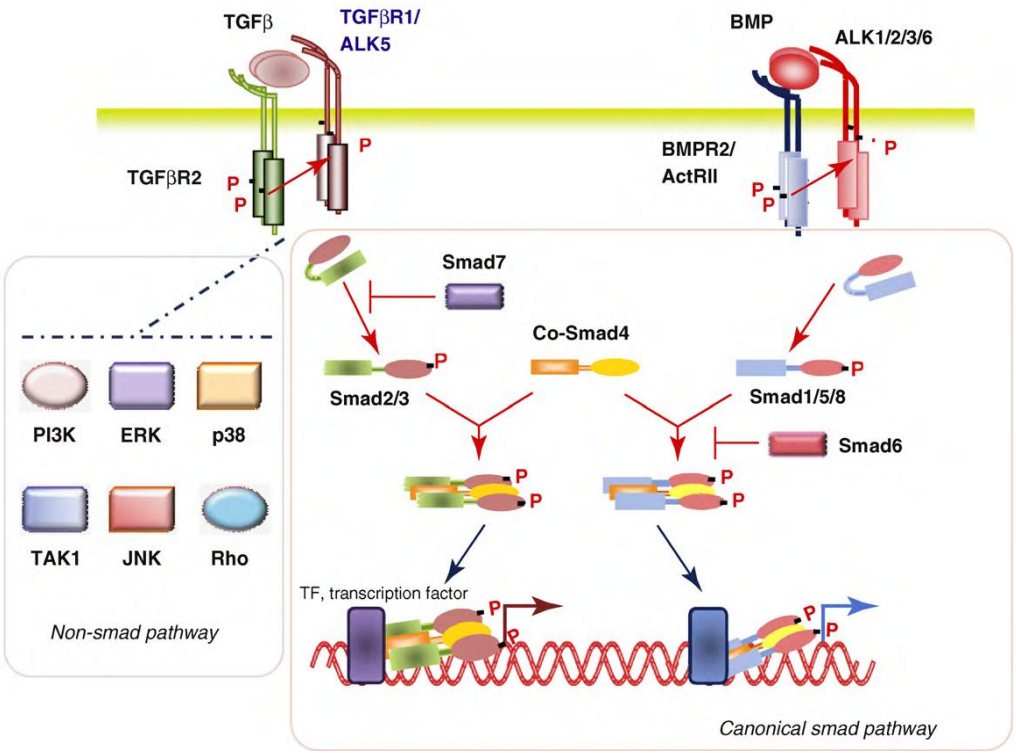



**Fig. 13. Voies de signalisation du TGF-β.** Le TGF-β et les dimères de BMP induisent la formation d'un complexe hétéromère entre les deux types spécifiques de récepteurs – type I (TGFβR1/ALK5, ALK1/2/3/6) et type II (TGFβR2, BMPR2/ActRII). Les récepteurs de type II induisent la transphosphorylation de récepteurs de type I, conduisant à leur activation. Par la suite, le récepteur de type I propage le signal dans la cellule par phosphorylation de R-Smads, qui forment des complexes hétéromères avec Smad4 (Co-Smad). Ces complexes Smad se déplacent dans le noyau où peuvent réguler la transcription (voie canonique de signalisation Smad) en réagissant avec les autres facteurs de transcription. I-Smads 6 et 7 inhibent l'activation du récepteur de RSmads. Les récepteurs de type I activés peuvent également activer les voies de signalisation non-Smad (PI3K, ERK, p38, TAK1, JNK et Rho). ALK - kinase de récepteur type activine; BMP - protéine morphogénétique osseuse; BMPR - récepteur de BMP; ERK - kinase de réponse précoce; PI3K – phosphoinositol 3-kinase; TAK1 – kinase activée par TGF-β; JNK - c-Jun N-terminal kinase (mitogen-activated protein kinase 8), p38 - mitogen-activated protein kinases ; TGF-β - facteur de croissance transformant β; TGFBR - récepteur du TGF-β (Pardali *et al*. 2010).

## IV. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le tonus musculaire et la réactivité vasculaire

### IV.1. Rôle de la vasoréactivité dans le tonus musculaire et la rigidité artérielle

L'exploration de la capacité de paroi artérielle à répondre aux agents vasoconstricteurs ou vasorelaxants a été définie comme la réactivité vasculaire. Elle dépend de la fonction des CEs et des CMLVs. Les CEs modifient l'expression de leurs gènes et la libération de médiateurs vasoactifs de relaxation et de contraction en réponse aux changements de

contrainte de cisaillement (Schiffers *et al*. 2000). Par leurs médiateurs vasoconstricteurs et vasorelaxantes les CEs ont une influence directe sur les CMLVs sous-jacentes qui se traduit par la modulation du tonus myogénique et du couplage contraction/relaxation. Dans les conditions physiologiques, le taux de médiateurs vasorelaxants prévaut sur le taux de vasoconstricteurs.

L'endothélium grâce à la libération de substances vasoactives telles que l'oxyde nitrique (NO) peut modifier l'état contractile des CMLVs et moduler les propriétés élastiques de vaisseaux. L'endothélium constitue non seulement une source importante de NO, mais aussi d'autres molécules de signalisation telles que le facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium (EDHF), le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) et la prostacycline (PGI2) qui ont des propriétés tant vasodilatatrices que vasoconstrictrices. L'$H_2O_2$ dérivé de l'endothélium est actuellement l'EDHF qui possède des fonctions vasodilatatrices dominantes (Takaki *et al*. 2008). L'endothélium, par le transfert de médiateurs chimiques (le NO, la PGI2) et le couplage électrique *via* les jonctions myoendothéliales, peut influencer l'activité mitogène, l'adhésion des neutrophiles et moduler la vasodilatation. La relaxation des CMLVs sous-jacentes de l'endothélium peut intervenir par la PGI2 qui est produite à partir de l'acide arachidonique (AA) par l'enzyme cyclo-oxygénase (COX) dans des CEs. La PGI2 facilite la libération du NO qui potentialise la relaxation des CMLVs par l'inhibition de la phosphodiestérase (Delpy *et al*. 1996). Les effets de PGI2 sont moins importants que ceux du NO mais ils sont liés.

Le NO est un vasodilatateur majeur qui joue un rôle central non seulement dans la vasodilatation mais aussi dans la régulation de la PA et de l'hémostase, dans le système nerveux central et périphérique comme second messager, dans l'adhésion et la migration des leucocytes, dans la prolifération cellulaire et la contractilité du myocarde. Les réponses au NO dépendent de l'activation de la guanylyl cyclase soluble (sGC) et la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP), conduisant à la vasorelaxation. Le nitroprussiate de sodium (SNP) et la nitroglycérine sont des exemples de donneurs NO qui induisent une relaxation des muscles lisses par l'augmentation de cGMP (Bivalacqua *et al*. 2001). Il a été montré que l'induction du NO peut être induite par les intégrines membranaires : l'utilisation de l'anticorps spécifique LM609 contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ favorise une réduction importante de la production de NO dans les CEs (Derkach *et al*. 2010).

La perturbation de la fonction endothéliale est un indicateur précoce du développement des maladies vasculaires (Triggle *et al*. 2012). Les maladies telles que l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance

cardiaque sont liées au dysfonctionnement endothélial et aux altérations de voies de signalisation du NO (Schyvens *et al*. 2004). La dysfonction endothéliale se traduit par une diminution de la biodisponibilité du NO suite à une diminution de sa production ou à une augmentation de sa consommation (Derkach *et al*. 2010). La vasoconstriction endothélium-dépendante résulte de la libération de substances telles que les radicaux libres dérivés de l'oxygène, l'Ang II et l'endothéline-1 (ET-1) (Barrett *et al*. 2013). Le NO et l'ET-1 (agent vasoconstricteur endogène le plus puissant) sont des antagonistes mutuels. Ils agissent l'un sur l'autre afin de maintenir un équilibre dans le tonus vasculaire (Terzi *et al*. 1997). Chez les patients présentant une dysfonction endothéliale et une diminution de la biodisponibilité du NO la vasoconstriction induite par l'ET-1 est prédominante ce que favorise des lésions vasculaires. La dysfonction endothéliale peut être provoquée par le stress oxydatif avec une augmentation de la production de l'anion $O^{2-}$ (Cai et Harrison 2000).

Le NO est synthétisé par la NO synthase (NOS) dans les CEs. La NOS catalyse l'oxydation d'arginine par la voie NADPH-dépendante jusqu'au L-citrulline et NO (Akopova *et al.* 2016). La NOS existe sous 3 isoformes : une forme endothéliale (eNOS), une forme inductible (iNOS) et une forme neuronale (nNOS). Les formes eNOS et nNOS sont $Ca^{2+}$-dépendantes et constitutives, elles produisent du NO en faibles quantités. En revanche, iNos est $Ca^{2+}$-indépendante et induite par des cytokines. Elle est capable de produire du NO en grandes quantités qui peuvent être cytotoxiques et inhiber des pathogènes. Ces trois formes sont ubiquitaires et exprimées au niveau de plusieurs types de cellules (Sainz *et al*. 2004).

L-NMMA (L-NG-monométhyl arginine) et L-NAME (Nω-nitro-L-arginine methyl ester) sont les deux analogues structurels de la L-arginine et peuvent se lier à la NOS en étant des inhibiteurs compétitifs pour la production du NO (Sainz *et al*. 2004). Il a été proposé que le NO augmente l'élasticité artérielle : chez l'homme sain, L-NNMA diminue la compliance et augmente la VOP de l'artère brachiale, mais l'administration de la nitroglycérine (donneur de NO) inverse tous ces effets (Kinlay *et al*. 2001).

Il a été montré qu'avec l'âge il y a une diminution de la libération de PGI2 par les CE (Nicholson *et al*. 2009) ainsi que de la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante induite par l'acétylcholine (Ach) lié à la réduction de la biodisponibilité du NO. Le NO est conservé et sa production est même augmentée chez les sujets âgés, mais la perte d'effets de l'Ach dans des CEs se développe à cause de l'inactivation accrue du NO par les radicaux libres et/ou d'une augmentation de médiateurs vasoconstricteurs tels que l'ET-1 (Van der Loo *et al* 2009 ; Westby *et al*. 2011), le thromboxane (TXA2) ou certaines prostaglandines (Wong *et al*. 2010).

## IV.2. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les fonctions des CMLVs et réactivité vasculaire

### *IV.2.1. Interaction aldostérone – récepteur minéralocorticoïde vasculaire*

La réactivité vasculaire ainsi que le tonus myogénique sont augmentés chez les sujets hypertendus ce qui se caractérise par une augmentation de la réponse contractile aux vasoconstricteurs tels que le calcium et la phényléphrine – Phe (Henrion *et al*. 1997). La contraction est également plus élevée chez les jeunes rats hypertendus par rapport aux animaux jeunes contrôles et diminuée chez les animaux âgés (Safar *et al*. 2001). En revanche, la vasodilatation endothélium-dépendante induite par l'Ach est fortement diminuée dans l'aorte chez les souris sauvages hypertendues par rapport à leurs contrôles normotendus (Atkins *et al*. 2015).

Le système rénine-angiotensine-aldostérone joue un rôle crucial dans le développement de l'hypertension et de la rigidité vasculaire. L'aldostérone est le régulateur hormonal primaire connue pour agir sur les reins et le côlon où il favorise la rétention du sodium et de l'eau et l'excrétion de potassium, donc il est le facteur déterminant du volume de liquide extracellulaire. Classiquement, l'aldostérone augmente le volume sanguin, la PA et le débit cardiaque par l'interaction avec le récepteur nucléaire stéroïdien minéralocorticoïde (MR).

Jusqu'au début des années 2000, il était admis que la plupart des effets hypertensifs de l'aldostérone et/ou l'activation de MR étaient connectés à leurs effets dans les cellules épithéliales du néphron distal aldostérone-sensitive (ASDN) par la régulation de la réabsorption rénale du sodium et du liquide extracellulaire. Pourtant la présence d'un mécanisme rénal seul a été mise en doute : une méta-analyse des essais cliniques a démontré que la réduction de la PA avec l'antagoniste du MR l'éplérénone, n'est pas liée aux changements des électrolytes plasmatiques et à l'activation du MR rénal (Levy *et al*. 2004). Les résultats des études précédentes ont montré que la PA pourrait être régulée non seulement par les reins mais aussi par le tonus vasculaire (Mendelsohn 2005). Il a été mis en évidence que parmi son expression classique dans les néphrons le MR est également exprimé dans les tissus non-épithéliaux, en particulier dans l'endothélium vasculaire (Nguyen Dinh Cat *et al*. 2010) et dans les CMLVs (McCurley *et al*. 2012). Ces résultats ont posé la question de l'implication de l'aldostérone et du MR dans les fonctions vasculaires, en particulier dans le tonus vasculaire et la rigidité artérielle.

D'autres études montrent que l'excès d'aldostérone circulante a des effets délétères par accumulation de fibres de collagène et de facteurs de croissance dans la paroi vasculaire, ce

que favorise l'augmentation de la VOP et le développement de la rigidité artérielle (Jaffe et Mendelsohn 2005 ; Lacolley *et al*. 2002 ; Calvier *et al*. 2013 ; Galmiche *et al*. 2014 ; Jaisser et Farman 2016). Un taux plasmatique élevé d'aldostérone est associé avec la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose, une rigidité artérielle accrue et l'inflammation aortique, avec une augmentation de protéine C réactive (CRP) chez les sujets obèses normotendus (Cooper *et al*. 2012 ; Nguyen Dinh Cat et Jaisser 2012). La surrénalectomie chez les patients avec l'adénome produisant l'aldostérone a permis d'empêcher le développement de la rigidité et même d'inverser des changements pathologiques dans les vaisseaux (Rosa *et al*. 2012 ; Lin *et al*. 2012). Chez les patients avec un hyperaldostéronisme primaire le risque CV et les endommagements de la paroi artérielle (fibrose, rigidité) sont plus importants par rapport aux patients avec la même sévérité d'hypertension non dépendante de l'aldostérone (Štrauch *et al*. 2006 ; Bernini *et al*. 2008 ; Gustafsson *et al*. 2011).

Les antagonistes du MR (MRA) tels que l'éplérénone ou la spironolactone ont été démontré comme traitement efficace de l'hypertension par leur interaction avec MR extrarenal en empêchant le développement de l'insuffisance cardiaque postischémique et de la rigidité vasculaire chez l'homme (Funder 2013 ; Takeda 2009) et dans des modèles expérimentaux (Lacolley *et al*. 2002 ; Nehme *et al*. 2005 ; Nehme *et al*. 2006 ; Takeda 2009 ; Resch *et al*. 2011). Lacolley *et al*. ont montré que l'éplérénone prévient l'augmentation de marqueurs de la rigidité artérielle tels que la PA, la PP et le module élastique dans les gros vaisseaux de rats traités à l'aldostérone (Lacolley *et al*. 2002).

### *IV.2.2. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les changements structuraux et fonctionnels des vaisseaux*

L'aldostérone agit sur le système cardiovasculaire en stimulant l'hypertrophie, l'hyperplasie des CMLVs et la migration de cellules de l'adventice vers la média en modifiant la morphologie vasculaire. L'aldostérone active la synthèse de protéines (le collagène de type III et la fibronectine cellulaire EIIIA), et le dépot du collagène dans la MEC au cours du développement de la fibrose vasculaire (Nehme *et al*. 2006 ; Bernini *et al*. 2008). L'interaction entre le MR et le récepteur à l'Ang II AT1R joue un rôle crucial dans la fibrose : l'Ang II peut activer la voie du MR indirectement via la voie d'EGFR (Jaisser et Farman 2016).

Plusieurs études ont montré le rôle du MR vasculaire dans la modulation de la vasoconstriction et vasorelaxation : l'interaction aldostérone/MR vasculaire et son influence sur la régulation de la PA et de tonus musculaire a été étudié dans des modèles animaux transgéniques. Le MR est exprimé dans les CEs et les CMLVs, et les altérations génétiques de

l'expression du MR dans ces types de cellules peuvent moduler les fonctions vasculaires chez la souris (Nguyen Dinh Cat *et al*. 2010 ; McCurley *et al*. 2012 ; Schäfer *et al*. 2013). Le mécanisme potentiel de l'interaction de l'aldostérone avec le MR comprend une activation d'ET-1, d'Ang II, d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et de TGF-β1 ainsi qu'une inhibition de la synthèse et consommation du NO *via* l'inhibition de la eNOS et de la norépinéphrine (Nagata *et al*. 2006 ; Lacolley *et al*. 2002).

Le rôle du MR endothélial a été montré par Nguyen Dinh Cat *et al*. (2010) dans le modèle de souris transgéniques avec une surexpression du MR dans les CEs : il y a une augmentation de la PA au niveau basal et après perfusion d'Ang II ou d'ET-1 avec une augmentation de la contraction des artères de résistance en réponse à l'Ang II, au ET-1 et à la Phe sans remodelage vasculaire chez les souris surexprimant le MR. Chez les souris avec une invalidation du MR dans les CEs il y a une diminution de la dysfonction endothéliale induite par l'obésité ou par le traitement désoxycorticostérone/sel avec une amélioration de la relaxation en réponse à l'Ach (Schäfer *et al*. 2013 ; Rickard *et al*. 2014). L'activation du MR endothélial favorise une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase avec une production accrue de ROS et la réduction de leur dégradation par une diminution de l'activité de l'enzyme antioxydant glucose-6-phosphate dehydrogénase (G6PD). Ce déséquilibre induit une altération de la biodisponibilité du NO, mais des antagonistes du MR préviennent les effets de ce récepteur sur le stress oxydatif (déséquilibre de la production de ROS/disponibilité du NO) et ses conséquences sur la réactivité vasculaire (Leopold *et al*. 2007).

L'état contractile des CMLV est dynamique et régulé par les stimuli hormonaux et neuronaux. Les CMLVs jouent un rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaire. L'inactivation du MR dans les CMLV a été récemment décrite par McCurley *et al*. (2012) et Galmiche *et al*. (2014). L'absence du MR dans des CMLVs prévient l'augmentation de PA avec l'âge et après perfusion d'Ang II (McCurley *et al*. 2012 ) sans altération de l'homéostasie du sodium rénal chez la souris adulte (Galmiche *et al*. 2014). L'expression du MR dans les CMLVs augmente *in vivo* la rigidité en réponse à l'aldostérone et au taux élevé de sel par la modulation de l'expression de protéines d'attachement cellules-matrice et le remodelage de la MEC (Galmiche *et al*. 2014). L'activation du MR dans les CMLVs induit *in vitro* l'expression de marqueurs pro-fibrotiques tels que la cardiotrophine 1, la galectine 3 et la lipocaline 2 (Calvier *et al*. 2013 ; Jaisser et Farman 2016) et déclenche l'inflammation et la fibrose cardiaque et vasculaire *in vivo* (McCurley et Jaffe 2012 ; Brown 2013 ; Pruthi *et al*. 2014).

### *IV.2.3 Régulation des mécanismes intracellulaires de la contraction et de la relaxation des CMLVs : l'implication du récepteur minéralocorticoïde*

Le tonus basal des CMLVs est déterminé par les protéines de l'appareil contractile actino-myosine. La contraction des CMLVs est déclenchée par une augmentation du $Ca^{2+}$ intracellulaire, soit par l'entrée du $Ca^{2+}$ extracellulaire via les canaux calciques de type L (LTCC) après la dépolarisation de la membrane, soit par la mobilisation des réserves de $Ca^{2+}$ intracellulaire après l'activation des récepteurs membranaires par des agonistes contractiles (Mendelsohn *et al*. 2005). Les agonistes contractiles (la Phe, l'ET-1 et l'Ang II) induisent une contraction des CMLVs par la phosphorylation de la myosine (MLC, 20 kDa) sur la Ser19 ce qui induit une activation de l'ATPase de la myosine qui est activée par l'actine. Ce processus est contrôlé par la MLCK qui peut être activée de manière $Ca^{2+}$/calmoduline (CaM)-dépendante et $Ca^{2+}$-indépendante (Feng *et al*. 1999 ; Isotani *et al*. 2004). La serine 1760 de la MLCK est adjacente au domaine de liaison à la calmoduline, et sa phosphorylation désensibilise la MLCK pour l'activation par la $Ca2^{+}$/calmoduline (Dulyaninova et Bresnick 2004). La phosphorylation de la MLCK au niveau de la Ser1760 par PKA/PAK1 inhibe l'ATPase de la myosine qui est activée par l'actine en réduisant son affinité pour l'actine (Isotani *et al*. 2004 ; Hudson et Bernal 2013). Le NO endothélial augmente le taux de la cGMP qui favorise la déphosphorylation de la myosine par la MLCP, ce qui entraîne la relaxation des CMLVs. La MLCP est composée d'une sous-unité catalytique de protéine phosphatase type 1 (PP-1c) delta de 38 kDa, d'une sous-unité de régulation MYPT1 de 110 kDa et d'une petite sous-unité de 20 kDa non-catalytique (Hirano 2007 ; Ma *et al*. 2010). L'activité de la MLCP peut être régulée par la MYPT1 qui fonctionne soit comme un activateur de la MLCP en ciblant le complexe MLCP avec son substrat MLC (Shimizu *et al*. 1994), soit comme un inhibiteur de la MLCP lorsque MYPT1 est phosphorylée sur un ou deux de ses sites de phosphorylation (T696 et T853) (Hirano 2007). La phosphorylation de MYPT1 au niveau de la Thr853 par la kinase Rho-associée (Rock) prévient l'inhibition de MYPT1 et par conséquent l'inhibition de la MLCP en améliorant la réponse contractile (Birukova *et al*. 2004). Un autre inhibiteur de la MLCP est CPI-17 (une protéine inhibitrice potentialisée par la protéine kinase C, 17 kDa) qui agit comme un pseudo substrat de la MLCP : en étant phosphorylée au niveau de la T38 il est en compétition avec la MLC (Hirano 2007).

La finalité de cette cascade est l'activation des canaux potassiques (canaux de large conductance $Ca^{2+}$-activés - BKCa) par les ions de $Ca^{2+}$ locaux sortant du réticulum sarcoplasmique (SR) et par la protéine kinase cGMP-dépendante (PKG). L'ouverture de ces

canaux $K^+$ permet l'hyperpolarisation des CMLVs, la diminution de l'entrée du $Ca^{2+}$ extracellulaire et la relaxation des CMLVs (Mendelsohn 2005) - Figure 14.

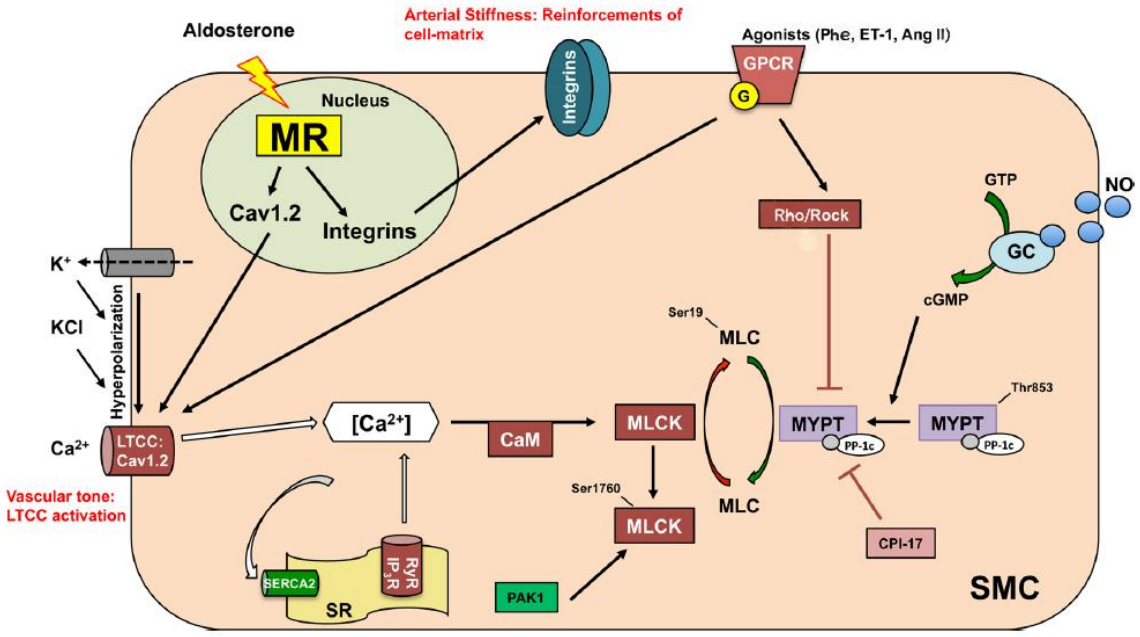



**Fig. 14. Rôle du MR des CMLVs dans le tonus vasculaire et la rigidité.** Le MR régule l'expression et l'activité vasculaire du LTCC (L-type $Ca^{2+}$ channel, Cav1.2) et des intégrines, contribuant ainsi à la rigidité artérielle et au tonus vasculaire. CaM – Calmoduline, Phe - phényléphrine, ET-1 - endothéline-1, Ang II - angiotensine II, SR – réticulum sarcoplasmique, SERCA2 - réticulum sarco/endoplasmique $Ca^{2+}$-ATPase2 (d'après Barrett *et al*. 2013).

Le MR des CMLVs augmente l'expression et la fonction des canaux calciques LTCC et de leur sous-unité Cav1.2 et diminue l'expression de canaux potassiques BKCa ce que conduit à une augmentation de la contraction vasculaire (DuPont *et al*. 2014). L'expression et l'activité des canaux LTCC et de Cav1.2 sont fortement réduites dans les vaisseaux de souris Knock-out pour le MR dans des CMLVs ($MR^{SMKO}$). Ces résultats confirment le rôle direct du MR des CMLVs dans la régulation de l'expression et de l'activité des canaux calciques vasculaires qui sont des médiateurs importants de la contraction et tonus myogénique ; le MR des CMLVs contribue directement à la régulation de la PA par les mécanismes non-rénaux (Barrett *et al*. 2013).

## V. Rôle de la vimentine et de la synémine dans le développement de la rigidité artérielle

Les protéines des filaments intermédiaires (IF) constituent l'un des trois systèmes principaux (microtubules, microfilaments et IF) du cytosquelette des cellules eucaryotes (Janmey *et al*. 1991 ; Wang *et al*. 2000). Ces protéines appartiennent à une famille hétérogène qui est divisée en quatre sous-familles: vimentine-like, kératines de type I et II et protéines neuronales. Toutes ces protéines ont une super-hélice alpha centrale commune et un domaine tige au centre du filament qui est formé par un ensemble de sous-unités monomériques non polaires et anti-parallèles. L'hétérogénéité des IF se reflète dans l'expression tissu-spécifique des monomères de protéines individuelles. Les kératines forment le groupe le plus large, dont les membres sont distribués entre les différents épithéliums. Dans le muscle cardiaque, squelettique et viscéral les IF se composent uniquement de la desmine, qui appartient à la sous-famille des protéines du type vimentine-like. Dans les CMLVs il y a une certaine hétérogénéité dans la composition des IF avec une co-expression de desmine et de vimentine (Small et Gimona 1998).

La vimentine est une protéine principale des IF de type III (57kD) qui a été trouvé dans des précurseurs de neurones du système nerveux central et de cellules mésenchymateuses au cours du développement embryonnaire (Steinert *et al*. 1999). Au cours du développement la vimentine est progressivement remplacée par des protéines d'IF de type IV telles que l'internexine-α, la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) qui est un membre tissu spécifique des IF dans les cellules gliales ou par la desmine dans des cellules musculaires (Eckes *et al*. 1998). Chez les mammifères adultes (homme, rat, lapin, porc, vache) la vimentine est exprimée principalement dans les cellules dérivées de mésenchyme : les astrocytes et macroglie du système nerveux central (Mendez *et al*. 2014), les fibroblastes, les cellules lymphatiques, les CEs et les CMLVs (Gabbiani *et al*. 1981 ; Nayak *et al*. 2013). Chez l'homme et chez le lapin la vimentine et la desmine sont distribuées de manière différente dans les vaisseaux et peuvent coexister à l'intérieur de mêmes cellules (Berner *et al*. 1981 ; Osborn *et al*. 1987). Il y a un gradient du rapport vimentine/desmine dans l'arbre vasculaire chez l'homme et chez les rongeurs : le contenu en vimentine le plus élevé se trouve dans des artères de gros calibre telles que l'aorte alors que les cellules desmine-positives sont prédominantes dans des artères du type musculaire telles que l'artère mésentérique et l'artère rénale (Osborn *et al*. 1981 ; Johansson *et al*. 1997 ; Wede *et al*. 2002).

La fonction de la vimentine a été révélée dans des études sur des souris vimentine KO ($Vim^{-/-}$). Il a été démontré que la vimentine est impliquée dans la prolifération des fibroblastes

en contrôlant la signalisation de TGF-β1-Slug (la protéine répresseur transcriptionnel qui contient un domaine avec du Zinc), l'accumulation du collagène et le processus de transition épithéliale -mésenchymateuse (EMT) dans la cicatrisation des blessures (Cheng *et al*. 2016), la fibrose (Nayak *et al*., 2013), l'angiogenèse (Bauer *et al*. 2016), l'extravasation des leucocytes à partir du système vasculaire (Nieminen *et al*. 2006), la différenciation des cellules tumorales (Schürch *et al*., 1990), la migration et le processus métastatique (Sridaran *et al*. 2016).

Les protéines d'IF (la vimentine et la kératine) induisent la rigidité *in vitro* quand elles se polymérisent en formant des gels avec des propriétés viscoélastiques (Janmey *et al*. 1991 ; Ma *et al*. 1999) et *in vivo* en étant dans le réseau cytosquelettique complexe intracellulaire (Wang et Stamenović 2000). Chez les rongeurs une gliose réactive de la rétine induit la rigidité des cellules gliales (module élastique) par le mécanisme d'ischémie-reperfusion. Cette rigidité est en corrélation avec la quantité d'IF (Lu *et al*. 2011). Les fibroblastes KO pour la vimentine ($Vim^{-/-}$) montrent une rigidité cellulaire réduite jusqu'au 40% par rapport aux cellules sauvages, liée à leur capacité de contracter la matrice de collagène (Eckes *et al*. 1998) ainsi que la diminution de la prolifération et de la synthèse d'ADN (Wang *et al*. 2000). Les cellules $Vim^{-/-}$ ne gardent pas la même morphologie et deviennent plus déformables, leur motilité diminue ainsi que leur capacité d'adhésion au substrat devient plus faible ce qui pourrait souligner la responsabilité de la vimentine à maintenir l'intégrité cellulaire (Guo *et al*. 2013). La vimentine joue un rôle clé dans la mécanotransduction du stress mécanique et l'adaptation vasomotricielle, et sa présence est indispensable pour la fonction des CEs et des CMLVs : elle protège les cellules contre le stress compressif en gardant leur élasticité et l'intégrité mécanique. La perte de la vimentine induit la perturbation de leurs propriétés viscoélastiques et de la résistance au stress (Mendez *et al*. 2014).

Les travaux précédents ont montré que la déformabilité des lymphocytes T du sang périphérique dépend principalement de la présence de filaments de vimentine intacts et que la perturbation de ces filaments est un élément essentiel pour la migration transendothéliale induite par les chimiokines (Brown *et al*. 2001). L'expression de la vimentine dans les CEs contribue également à former des structures d'ancrage pour aider à l'extravasation des leucocytes du système vasculaire (Nieminen *et al*. 2006). Il a également été montré que le réseau des filaments de vimentine et d'actine est un facteur très important pour les CEs dans la régulation de la perméabilité endothéliale au niveau moléculaire : le réseau de filaments de vimentine intacte est essentiel pour protéger la barrière endothéliale contre les perturbations induites par l'hypoxie (Liu *et al*. 2010, 2014) et pour l'expression des molécules d'adhésion

ICAM-1 et VCAM-1 à la surface de CE set des intégrines $\beta_1$ sur les cellules sanguines mononuclées (Nieminen *et al*. 2006).

Dans les vaisseaux, la vimentine qui est la principale protéine structurale du cytosquelette, est très sensible au stress mécanique induit par le flux sanguin (contrainte de cisaillement). Il a été montré que les filaments de vimentine deviennent plus rigides avec l'augmentation de la contrainte mécanique (Eckes *et al*. 1998). Chez les souris KO pour la vimentine, il y a un déséquilibre de synthèse d'ET-1 et du NO avec une prédominance d'ET-1 et diminution de la sensibilité au NO, et par conséquent, une perturbation du tonus myogénique avec diminution de la dilatation flux-dépendante des artères de résistance. Il a été constaté que les hormones telles que l'ET-1 et l'Ang II induisent la phosphorylation de la vimentine dans les CMLVs (Terzi *et al*. 1997). L'absence de vimentine peut moduler les réponses vasomotrices aux stimuli mécaniques et chimiques (les agents contractiles et relaxants) à cause de la perte d'équilibre entre l'ET-1 et NO (Henrion *et al*. 1997 ; Terzi *et al*. 1997) et promouvoir le remodelage artériel chronique (Schiffers *et al*. 2000).

Des études ont montré la participation de la vimentine à la formation de filaments du cytosquelette qui font des liaisons entre le noyau cellulaire et la membrane plasmique dans les CEs (Maniotis *et al*. 1997). Des travaux suivants ont confirmé son implication dans la formation de contacts focaux avec les intégrines membranaires ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$) et dans la realisation du transfert direct de forces mécaniques de la surface cellulaire au noyau (Tsuruta et Jones 2003 ; Kreis *et al*. 2005 ; Bhattacharya *et al*. 2009). Dans une CML différenciée, le réseau de vimentine se connecte au desmosome sur la membrane cellulaire puis se lie aux corps denses dans le cytoplasme qui permet aux filaments de vimentine de promouvoir la transmission de forces inter- et intracellulaires dans le muscle lisse. En réponse à des changements environnementaux, la vimentine subit une phosphorylation et déphosphorylation réversible de la Ser-56, qui joue un rôle important dans la régulation des cycles de contraction/relaxation du muscle lisse. PP1 et PP2A sont des phosphatases à sérine/thréonine qui contrôlent la déphosphorylation de la Ser-56 de la vimentine dans le muscle lisse. La PP1 est une protéine-clé qui régule la polymérisation de l'actine en modulant la dissociation de la p130CAS (le substrat p130 Crk-associé) de la vimentine (Li *et al*. 2016). La phosphorylation de la MLC par PP1 au niveau de la Ser-19 est aussi un mécanisme cellulaire important qui régule la contraction du muscle lisse. La phosphorylation de la Ser-19 de la MLC augmente l'activité de la myosine ATPase et initie le genèse de forces contractiles (Figure 15).

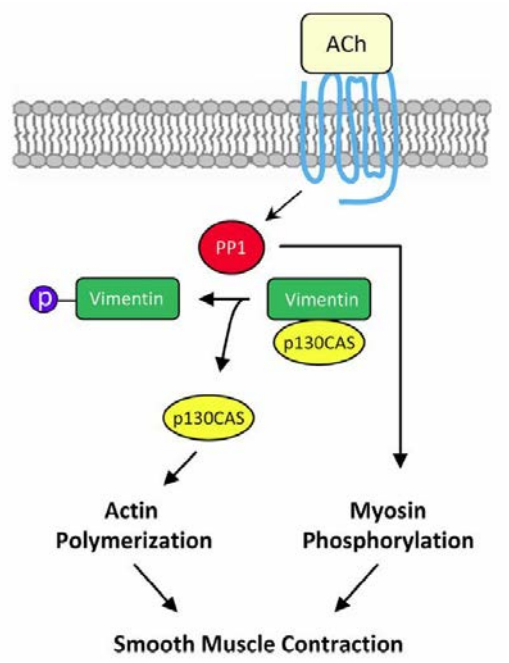



**Fig. 15. Régulation de la vimentine par la protéine phosphatase1 (PP1).** En réponse à une stimulation par des agonistes, PP1 est dissociée de la vimentine et inhibée, ce qui augmente la phosphorylation de la vimentine sur Ser-56. La vimentine phosphorylée favorise la dissociation de p130CAS ce qui fournit plus de p130CAS «libre» pour la polymérisation de l'actine. PP1 peut également réguler la phosphorylation de la myosine. La polymérisation de l'actine et l'activation de la myosine sont les deux étapes indispensables pour la contraction des CML (Li *et al*. 2016).

La synémine est une protéine des IF de type IV (Li *et al*. 2014) et chez l'homme elle possède trois variants d'épissage : α, β (desmuslin) et L avec des domaines caudales de taille variable. Les variants α- et β-synémine sont plus grands que la plupart des protéines des filaments intermédiaires (1565 et 1253 acides aminés respectivement), alors que la L-synémine est plus courte (339 acides aminés). Les isoformes de synémine n'ont pas de capacité d'auto-assemblage aux filaments intermédiaires et ils ont besoin de la vimentine ou de la desmine comme partenaires pour co-polymériser et former le réseau d'IF (Xue *et al*. 2004 ; Khanamiryan *et al*. 2008). La synémine est présente dans tous les types de cellules musculaires, dans quelques types de cellules neuronales, et dans les autres types de cellules non épithéliales. Au cours du développement l'expression de la synémine est régulée de manière isoforme-spécifique dans les cellules du système nerveux, les cellules souches pluripotentes, les cellules de la rétine, du muscle, du foie et dans les CEs. La synémine exprimée dans les CEs est toujours liée à la vimentine et effectue l'ancrage de la vimentine (*via* son domaine C-terminal) aux composants membranaires tels que la VE-cadherine (Izmiryan *et al*. 2009).

Dans le muscle strié et le muscle lisse, la synémine est colocalisée avec des filaments de vimentine et interagit avec la desmine, l'α-actinine (un composant majeur de disques-Z), la dystrophine et avec l'utrophine. Elle peut former des hétéropolymères avec la vimentine ou la desmine et lie les IF aux disques-Z de myofibrilles adjacentes ou au costamère qui est un complexe protéique sous-sarcolemmique aligné dans le registre avec les disques-Z et qui est connecté physiquement aux sarcomères (Tang 2008). Les souris déficientes pour la synémine ($Syn^{-/-}$) développent un phénotype myopathique avec la dégénérescence de myofibrilles et des défauts dans les membranes sarcoplasmiques possiblement à cause de l'absence de liaison de la synémine aux costamères et sarcomères et aux filaments de desmine et vimentine. La liaison de la synémine à des protéines costamériques et sarcolemmiques telles que l'α-actinine, la vinculine et les membres du complexe dystroglycan est nécessaire pour l'intégrité membranaire (Paul et Skalli 2016). Au cours d'une surcharge mécanique, les muscles squelettiques des souris $Syn^{-/-}$ développent une hypertrophie avec une augmentation de la force maximale isométrique et de la résistance à la fatigue. De plus, l'absence de la synémine empêche l'auto-renouvellement et la différenciation de cellules myosatellites (Li *et al*. 2014). Il a été montré que dans les cardiomyocytes chez les rats adultes, la synémine est localisée aux disques-Z avec la desmine et la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA) (Russell *et al*. 2006). La PKA effectue la phosphorylation de myofilaments et des protéines du cytosquelette en régulant la myofibrillogenèse, la différentiation et le remodelage de myocytes, y compris au cours du développement des pathologies CV. La synémine, en étant la protéine d'ancrage de PKA, est surexprimée dans les cardiomyocytes chez les patients avec une insuffisance cardiaque. Dans les cellules d'astrocytome, la synémine régule la prolifération en modulant l'état de phosphorylation d'Akt. Il a été suggéré que ses fonctions sont la liaison de protéines entre les IF et les membranes cellulaires ainsi que la régulation des voies de signalisation de PKA et d'Akt (Russell *et al*. 2006 ; Paul et Skalli 2016).

# HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Notre hypothèse de travail est que le phénotype artériel physiologique dépend de plusieurs paramètres tels que les récepteurs membranaires, les intégrines et les protéines du cytosquelette des CMLVs. La perturbation de ces marqueurs physiologiques pourrait induire le développement de la rigidité et de la fibrose artérielle ce qui augmente le risque CV.

Notre objectif est de montrer que les CMLVs et leurs interactions avec la MEC sont des facteurs majeurs dans le développement de la rigidité et la fibrose artérielle qui jouent un rôle principal dans les mécanismes périphériques de l'insuffisance cardiaque. Le second objectif est de déterminer des cibles thérapeutiques possibles pour le traitement de la rigidité et la fibrose vasculaire. Afin de réaliser ces objectifs nous avons identifié l'influence de récepteurs membranaires tels que le récepteur minéralocorticoïde (MR) et la sous-unité $\alpha_v$ d'intégrines ainsi que les protéines des filaments intermédiaires (la vimentine et la synemine) du cytosquelette des CMLVs sur le phénotype artériel, la fonction vasculaire et le développement de la rigidité et de la fibrose artérielle.

**Les objectifs plus spécifiques sont les suivants :**

- Evaluation de la contribution spécifique du MR dans la réactivité vasculaire, notamment le rôle d'invalidation constitutive de ce récepteur dans la contraction et la relaxation d'anneaux carotidiens et aortiques chez les souris contrôles et invalidées pour le récepteur minéralocorticoïde dans des CMLVs ($MR^{SMKO}$) ;
- Caractérisation du phénotype artériel (la structure et le contenu de la paroi artérielle, les paramètres hemodynamiques - la distensibilité, l'elasticité) des souris $\alpha_v^{SMKO}$ au niveau de base et après administration d'Ang II ;
- Etude de l'expression des protéines impliquées dans les voies de signalisation des adhésions focales chez les souris contrôles et invalidées pour la sous-unité $\alpha_v$ à l'état basal et dans un modèle de fibrose vasculaire ;
- Etude de l'implication des protéines des filaments intermédiaires du cytosquelette (la vimentine, la synemine) dans le développement de la rigidité artérielle ;
- Analyse des changements structuraux et fonctionnels des CMLVs et des CEs (ultrastructure, expression des marqueurs d'adhésions focales et des intégrines) chez les souris KO pour la vimentine

# MATERIELS ET METHODES

# I. Modèles animaux expérimentaux

## I.1. Souris invalidées pour le récepteur minéralocorticoïde (MR) dans des CMLV

Les animaux ont un background C57BL/6. Ils ont été obtenus par l'équipe du Pr. Frédéric Jaisser (Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U1138, Paris). Le modèle murin est obtenu par la méthode Cre-Lox par croisement de deux lignées de souris : une lignée de souris floxées pour le MR dans des CMLV ($MR^{fl/fl}$), une lignée de souris portant le gène Cre-récombinase sous le contrôle du promoteur SM22alpha. Ce croisement a permis d'obtenir la délétion constitutive du MR dans les CMLV ($MR^{SMKO}$). Comme contrôles nous avons utilisé les souris floxées pour le MR dans des CMLV qui n'ont pas le gène Cre-récombinase (CTL = $MR^{fl/fl}$). Le génotype des souris a été confirmée par PCR à l'âge de 5 mois (Galmiche *et al*., 2014). Nous avons étudié la réactivité vasculaire en utilisant la méthode du myographe Mulvany et l'expression des protéines d'appareil contractile des CMLVs par la méthode du Western Blot.

## I.2. Souris invalidées pour la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans des CMLVs

Nous avons développé le modèle d'invalidation conditionnelle de la sous-unité $\alpha_v$ chez les souris C57BL/6 à l'aide du système Cre-Lox. Ces souris ont été obtenues dans notre laboratoire par croisement de deux lignées : 1 - les souris floxées pour la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines ($\alpha_v^{flox/flox}$) qui nous ont été données par le Dr Adam Lacy Hulbert (Massachusetts General hospital - Boston, USA) ; 2 – la lignée SM22-$CreER^{TR}$ (souris avec l'insertion du gène (Knock-in = KI) codant pour l'enzyme Cre-récombinase inductible sous le contrôle du promoteur SM22 nous a été donnée par le Dr Zhenlin Li (CNRS UMR_8256, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI). Après croisement les souris $\alpha_v^{flox/flox}$ $Cre^{SMKI/+}$ et $\alpha_v^{flox/flox}$ $Cre^{SMKI/SMKI}$ sont considérées comme double KO ($\alpha_v^{SMKO}$). Les souris $\alpha_v^{+/+}$, $\alpha_v^{flox/+}$ et $\alpha_v^{flox/flox}$ issus des mêmes portées ont été retenues comme contrôles pour notre étude (WT). A partir de l'age 2 mois afin d'induire la délétion de l'intégrine $\alpha_v$ toutes les souris ont été induites par des injections consécutives de Tamoxifène (10 mg/mL dans huile d'arachide) par voie intrapéritonéale (IP) pendant trois jours : premier jour - injection à 200 µL/jour ; deuxième et troisième jour - injections à 100 µL/jour (Figure 16).

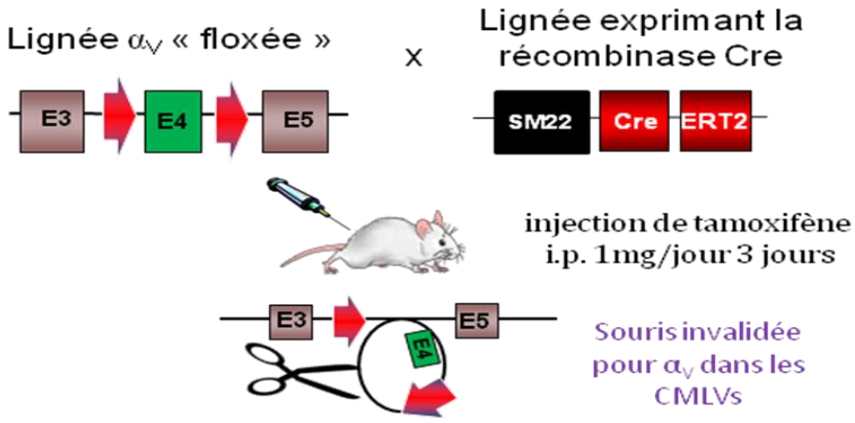



**Fig. 16. Modèle d'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans les CMLVs chez la souris adulte.**

Les études ont été effectuées sur des souris males et femelles adultes (4 – 9 mois). Le génotype des souris a été confirmé par PCR. Nous avons effectué les mesures hémodynamiques de la pression artérielle consciente par pléthysmographie ; de la rigidité et des propriétés élastiques d'artères par la méthode d'échotracking de l'artère carotide ; de la réactivité vasculaire par la méthode du myographe Mulvany ; l'histologie (méthodes de Weigert/Orcéine et de Rouge Sirius), et l'immunohistologie par détection colorimétrique et fluorescence et analyse confocale ; la mesure du signal de fluorescence du collagène total par la microscopie multiphotonique de la génération seconde harmonique (SHG) ; l'expression de protéines de signalisation des intégrines par la méthode du Western Blot et l'expression de gènes par la RT-qPCR.

### I.3. Souris invalidées pour vimentine et synemine dans des CMLV

Les animaux ont un background C57BL/6 et ont été fournis par le Dr Zhenlin Li (CNRS UMR_8256, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI). Les animaux sont obtenus par la méthode Cre-Lox par croisement de deux lignées de souris : 1 - les souris floxées pour la vimentine et/ou pour la synemine dans des CMLV ($Vim^{fl/fl}$, $Syn^{fl/fl}$ ou $Vim^{fl/fl}Syn^{fl/fl}$) ; 2 - les souris portant le gène Cre-récombinase sous le contrôle d'élément régulateur spécifique SM22alpha. Ce croisement a permis d'obtenir la délétion constitutive de la vimentine ($Vim^{-/-}Syn^{+/+}$), de la synemine ($Vim^{+/+}Syn^{-/-}$) ou des deux gènes vimentine et synemine ($Vim^{-/-}Syn^{-/-}$) dans les CMLV. Comme contrôles nous avons utilisé les souris floxées pour la vimentine et/ou pour la synemine dans des CMLV qui n'ont pas le gène de la Cre-récombinase ($Vim^{+/+}Syn^{+/+}$).

Les études ont été effectuées sur des souris males adultes (5 – 6 mois). Le génotype des souris a été confirmé par PCR. Nous avons effectué les mesures hémodynamiques de la

pression artérielle consciente par pléthysmographie ; de la rigidité et des propriétés élastiques d'artères par la méthode d'échotracking de l'artère carotide ; l'histologie (méthodes de Weigert/Orcéine et de Rouge Sirius), et l'immunohistologie par détection colorimétrique et fluorescence et analyse confocale ; l'ultrastructure de la paroi artérielle par microscopie électronique ; l'expression des protéines par la méthode du Western Blot et l'expression de gènes par la RT-qPCR.

### I.4. Conditions expérimentales

Les animaux ont été hébergés dans notre animalerie selon les conditions d'élevage en vigueur (température 20-22°C, humidité 55-65%, cycles jour-nuit de 12h, alimentation standard et boisson à volonté). Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les recommandations de la communauté européenne (directives 86/609/EEC, 2010/63/UE) et du comité éthique de Nancy.

## II. Protocoles expérimentaux : modèle de fibrose vasculaire induite l'Ang II

Après invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ les animaux ont été traités à l'Ang II afin d'induire une augmentation de la pression artérielle et une fibrose vasculaire. Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 3-3,5% sous un débit d'oxygène 1,5L/min. Une mini-pompe osmotique sous-cutanée (Alzet 2004) est implantée pour diffusion d'angiotensine II (Ang II) pendant 28 jours. Un groupe de souris (WT et $\alpha_v^{SMKO}$) a reçu une faible dose d'Ang II (0,3 mg/kg/jour) et un autre groupe – une forte dose d'Ang II (1,5 mg/kg/jour). Un groupe contrôle a été réalisé avec une opération sans pose de mini-pompe (Figure 17).

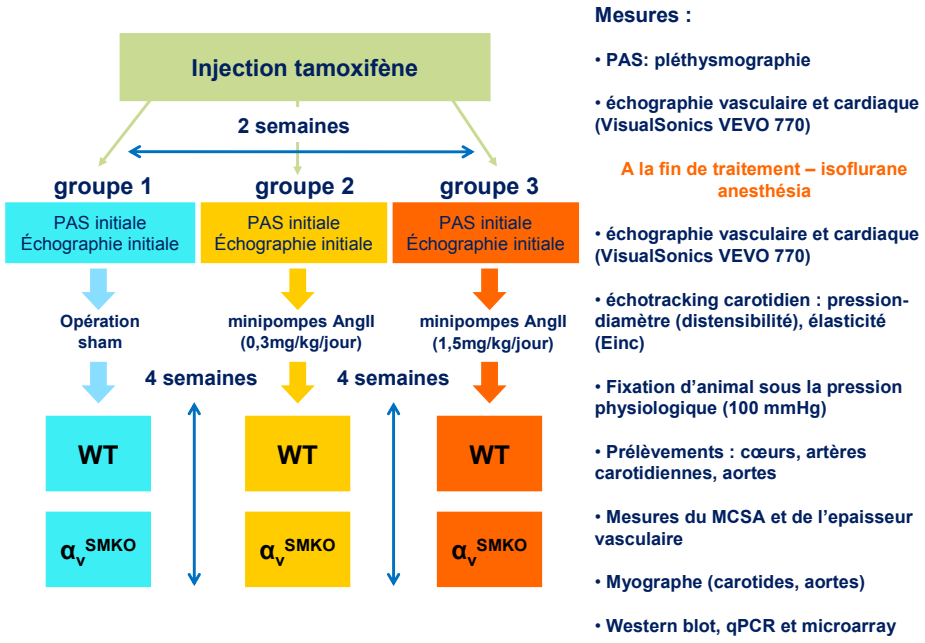



**Fig. 17. Schéma des manipulations :** PAS – pression artérielle systolique; MCSA - media cross-sectional area - la surface de coupe transversale médiale.

# III. Méthodes expérimentales

## III.1. Mesure de la pression artérielle chez l'animal conscient

Les mesures hémodynamiques réalisées *in vivo* chez l'animal conscient sont effectuées par pléthysmographie. Cette méthode permet d'étudier les variations du volume sanguin dans un organe en utilisant des techniques de mesure de déplacement de volume. Les souris sont placées dans une boîte de contention sur une plateforme chauffante (Hatteras Instruments, Blood Pressure Analysis System, model SC-1000), afin de s'assurer de la bonne dilatation des artères périphériques. La pression est mesurée sur l'artère caudale: la queue de l'animal est passée à travers un manchon gonflable (ballonnet) qui comprime l'artère caudale lorsque la pression dans ce ballonnet augmente. Lorsque la pression du ballonnet est égale à la pression systolique de l'artère, celle-ci est écrasée empêchant la circulation du sang. L'arrêt de la circulation du sang dans l'artère caudale est détecté par un capteur photoélectrique et est interprété par l'enregistreur comme étant la valeur de la pression systolique à l'aide du logiciel "SC 1000 BP analysis system" (Hatteras Instruments, Inc., NC, USA) (Figure 18).

Tous les animaux sont entraînés pendant 2-3 jours pour s'habituer à la procédure. Les mesures obtenues après quelques jours d'entraînement sont retenues comme reproductibles et utilisées pour les analyses. Pour les animaux traités à l'Ang II les mesures ont été effectuées avant d'implantation des minipompes et à 26-28 jours après le traitement.

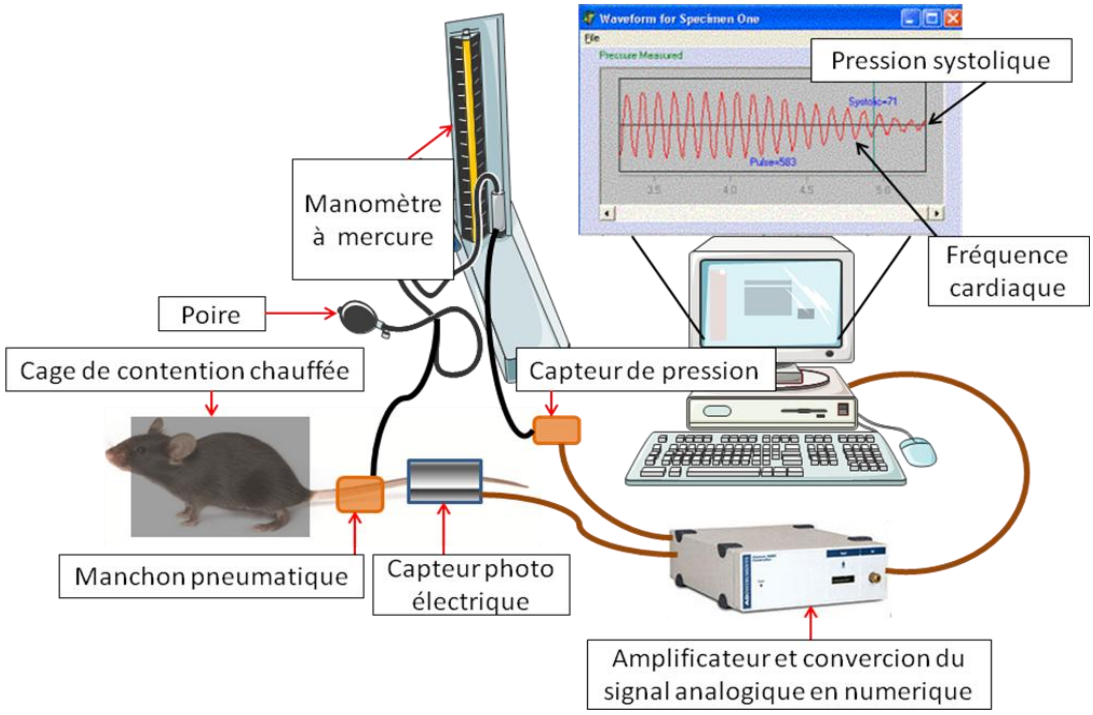



**Fig. 18. Schéma de la technique «tail-cuff» de mesure de la pression artérielle chez les souris éveillées, à partir de l'artère caudale.**

## III.2. Mesures hémodynamiques *in vivo* chez l'animal anesthésié

### *III.2.1. Préparation d'animal*

Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane (3-3,5%, débit d'oxygène 1,5L). Un cathéter de polyéthylène (PE-5, longueur 2 cm, BioSeb, France) est introduit dans l'artère carotide gauche puis l'artère carotide droite est recouverte de gel échographique. Le cathéter est relié au capteur de pression (P23XL, Becton Dickinson) et rempli de sérum physiologique hépariné (50 UI/ml).

### *III.2.2. Acquisition des signaux de pression intravasculaire*

Les mesures des pressions systoliques (PAS) et diastolique (PAD) sont effectuées à l'aide d'un système d'enregistrement de la pression (logiciel Ponemah P3Plus version 4.9). Ces mesures nous permettent de déterminer la pression pulsée (PP, qui correspond à la différence algébrique PAS-PAD) ainsi que la pression artérielle moyenne (PAM, qui correspond à PAD+PP/3).

### *III.2.3. Echotracking d'artère carotide*

Les paramètres mesurés sont les variations de pression et de diamètre de l'artère au cours du cycle cardiaque. Ces variations systolo-diastoliques du diamètre carotidien sont mesurées *in vivo* chez l'animal par des techniques utilisant les ultrasons, dérivées de l'échographie, complétées par des méthodes de poursuite d'échos (échotracking). Ces techniques ont déjà été décrites et validées chez le rat (Labat *et al*. 2001) et chez la souris (Lacolley *et al*. 2001; Mercier *et al*. 2006, Louis *et al*. 2007).

Une sonde ultrasonique est positionnée au dessus de la carotide primitive droite de l'animal anesthésié afin d'enregistrer les échos vibratoires des parois internes et externes de l'artère, visualisées sur un écran oscilloscopique (Philips PM 3057) (Figure 19). Les distances entre les interfaces acoustiques « sang-paroi artérielle» sont alors mesurées au cours du cycle cardiaque et permettent ainsi de déterminer le diamètre et la surface de la lumière artérielle *in vivo* (Labat *et al*. 2001). Les variations pulsatiles du diamètre et de la pression sont mesurées pendant trois périodes successives de 4 secondes. A l'aide de ces deux mesures simultanées, la courbe pression-diamètre est reconstituée dans l'intervalle de pression systolo-diastolique selon une fonction arc-tangente décrite par trois paramètres indépendants $\alpha$, $\beta$, $\gamma$.

Le calcul des paramètres mécaniques s'effectue comme suit :

Les modifications de la lumière artérielle en fonction de la pression artérielle (courbe pression-diamètre) sont calculées à partir de ces trois paramètres α, β, γ selon le modèle décrit par Langewouters (Tardy *et al*. 1991) :

$$LCSA = \alpha [ \pi/2 + \tan^{-1} (P-\beta)/ \gamma]$$

où LCSA (Lumen Cross Sectional Area) représente la surface sectionnelle de la lumière artérielle et P la pression.

La distensibilité est le rapport de la compliance circonférentielle à la surface de la lumière :

$$\text{Distensibilité} = (1/LCSA) \times (\delta LCSA/\delta P)$$

Le module élastique incrémentiel (Einc) permet d'évaluer les propriétés mécaniques intrinsèques du matériau constituant la paroi, indépendamment de la géométrie de l'artère :

$$Einc = 3/ \text{Distensibilité} \times (1 + LCSA\text{-}MCSA)$$

où la MCSA (Media Cross Sectional Area) représente la surface sectionnelle de la média. Les mesures de MCSA nécessaires au calcul du module élastique sont déterminées *in vitro* par méthode histomorphométrique après fixation au formol. La surface de la lumière artérielle ainsi que la distensibilité sont calculés *in vivo* à la PAM.

L'élasticité du matériau est évaluée à partir des courbes reliant la contrainte circonférentielle subie par l'artère au Einc. La contrainte circonférentielle WS (Wall Stress) témoigne de l'impact de la pression sur la paroi du vaisseau. Elle se calcule à partir des valeurs de LCSA et de MCSA pour différents niveaux de pression artérielle :

$$WS = (2 \text{ LCSA} \times P)/MCSA$$

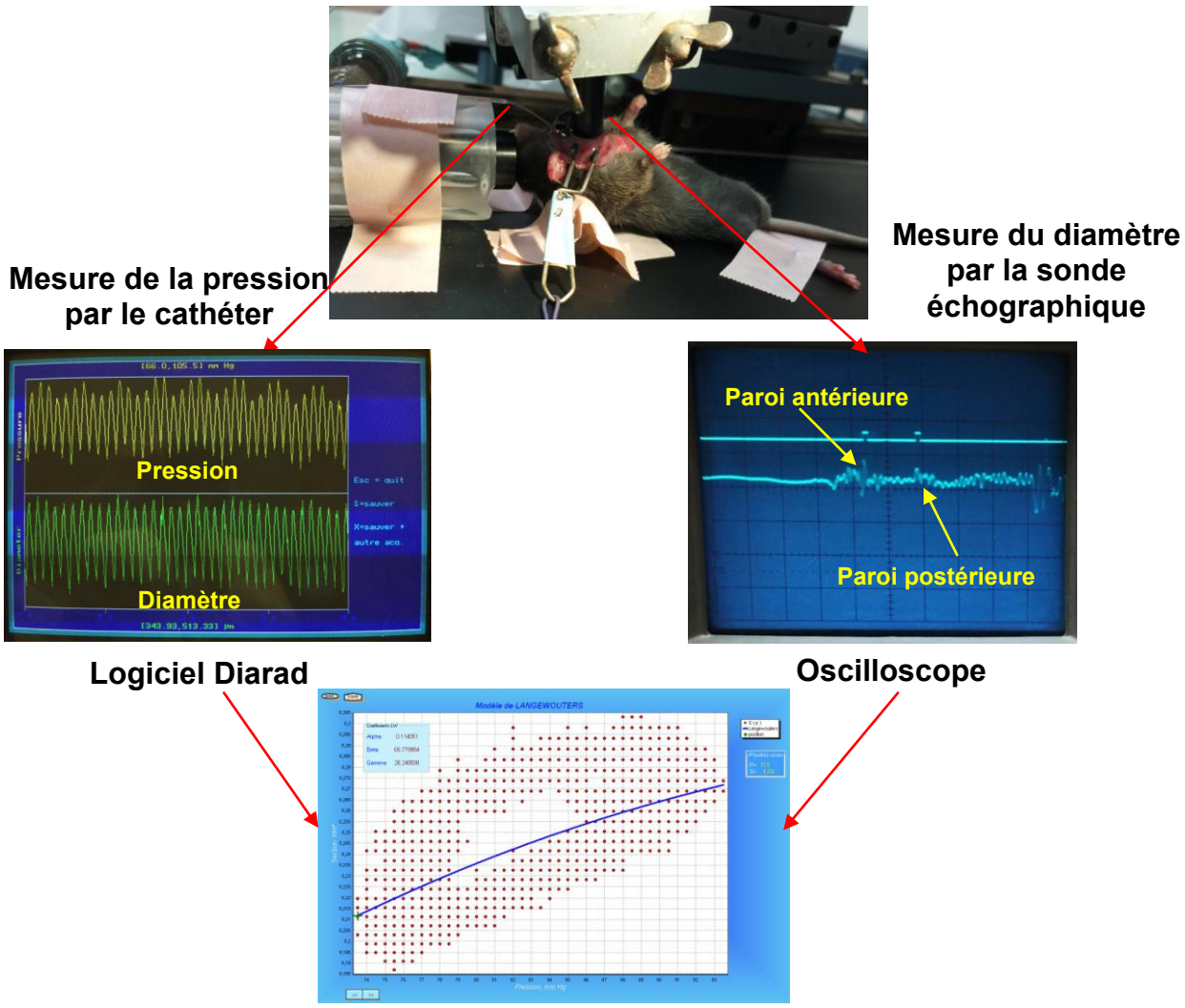



**Fig. 19. Schéma général d'obtention des courbes pression-diamètre par la technique d'échotracking d'artère carotidienne chez la souris.**

## III.3. Echographie vasculaire

### *III.3.1. Préparation d'animal*

L'animal est pré-anesthésié par isoflurane (3-3,5%, débit d'oxygène 1,5L/min) puis placé sur une platine chauffante lui permettant de rester à une température de 35°C pendant la durée d'enregistrement. Le maintien de l'anesthésie s'effectue en décubitus dorsal avec 1,5-2% d'isoflurane (débit d'oxygène 0,7 - 1L/min) par le masque attaché à la plaque chauffante. Une sonde mécanique de 30 MHz est utilisée pour la visualisation des différentes vues cardiaques et l'obtention des images échographiques.

### III.4 Réactivité vasculaire

Nous avons réalisé l'étude des effets du récepteur minéralocorticoïde (MR) et de l'intégrine $\alpha_v$ sur la réactivité vasculaire (aortes thoraciques et abdominales) en utilisant la méthode classique du myographe de Mulvany. Pour les souris contrôles ou mutées pour le MR nous avons comparé des anneaux aortiques avec endothélium intact (CTL+E, $MR^{SMKO}$+E) et endothélium endommagé après dénudation mécanique (CTL-E, $MR^{SMKO}$-E). Pour les souris avec invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ les réponses contractiles et relaxantes sont évaluées dans les carotides isolées de souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ non traitées et après le traitement par la dose forte d'Ang II.

Les carotides sont excisées et placées sur la glace dans du PSS de composition suivante (valeurs en mmol/L) : NaCl 130; KCl 3,7; $MgSO_4$ 1,2; $KH_2PO_4$ 1,2; $CaCl_2$ 1,6; $NaHCO_3$ 14,9 et glucose 11. Les artères sont isolées et soigneusement nettoyées des matières grasses, et des préparations d'anneaux (longueur 2,5 mm) sont effectuées. Les anneaux sont ensuite montés sur un fil-myographe Mulvany-Halpern (DMT, Aarhus, Danemark), dans un bain d'organe contenant 8 ml de solution de PSS oxygénée en continu par un mélange gazeux (75% $N_2$, 15% $O_2$, 5% $CO_2$) maintenue à 37°C avec un pH de 7,5. Les anneaux sont laissés à équilibrer pendant 30 minutes à une tension physiologique de repos de 1g (ou 9.8 mN – milliNewton), en renouvelant le milieu toutes les 15 minutes. Toutes les préparations sont contractées avec une solution isotonique de KCl (80 mmol/L) puis avec une solution de concentration sous-maximale de phenylepherine (Phe) $10^{-5}$ mol/L suivie d'une relaxation a l'acétylcholine (Ach) pour évaluer la capacité contractile de chaque anneau. La capacité contractile des CMLV a été évaluée à partir des anneaux avec un endothélium intact. Pour l'évaluation des phénomènes endothélium-non dépendants, l'endothélium a été enlevé des anneaux aortiques en frottant doucement l'intérieur des anneaux sur un crochet de l'appareil.

Les réponses contractiles à la Phe, KCl et $Ca^{2+}$ et les réponses dilatatrices à l'Ach, au donneur du NO - nitroprussiate de sodium (SNP) et au analogue synthétique de PGI2 tréprostinil ont été déterminées par l'addition cumulée des agonistes pour donner la concentration finale indiquée sur les courbes.

La contraction par la voie α-adrénergique était évaluée via la dose-réponse à la Phe de $10^{-9}$ à $10^{-4}$ mol/L. La contraction dépendante de l'activation des canaux calciques a été déterminée en utilisant la dose-réponse au KCl de 10 à 80 mmol/L. La réponse contractile au $Ca^{2+}$ extracellulaire en dose cumulative de $10^{-5}$ à $10^{-2}$ mol/L a été évalué sur les anneaux préincubés dans la solution sans $Ca^{2+}$ (80 mmol/L de KCl au lieu d'une quantité équimolaire de NaCl avec 2 mmol/L d'EGTA), puis dans la solution sans $Ca^{2+}$ et sans EGTA.

La relaxation endothélium dépendante est évaluée par la dose-réponse à l'Ach avec des anneaux précontractés à $10^{-5}$ mol/L de Phe, en présence ou en absence d'inhibiteur de NO-synthéase endothéliale L-NNA (Nω-nitro-L-arginine) ou L-NAME (Nω-nitro-L-arginine methyl ester) en $10^{-4}$ mol/L et en présence ou en absence d'inhibiteur de cyclo-oxygénase indométacine (Indo) en $10^{-5}$ mol/L. La relaxation endothélium – non dépendante et la sensibilité des CMLV à la voie de cyclo-oxygénase est évaluée après la précontraction à la Phe ($10^{-5}$ mol/L) sur les anneaux avec endothélium intact ou endommagé par la dose-réponse au SNP (de $10^{-9}$ à $10^{-5}$ mol/L) en présence ou en absence de $10^{-5}$ mol/L d'Indo ou au tréprostinil (de $10^{-9}$ à $10^{-5}$ mol/L).

La réponse maximale (Emax) et la concentration en agoniste provoquant 50% des réponses maximales (EC50) ont été déduites à partir des courbes dose-réponses individuelles. Le pD2 représente le logarithme négatif des valeurs d'EC50.

### III.5 Etudes de la structure artérielle

#### *III.5.1 Préparation des échantillons*

Une fois les mesures d'échotracking effectuées la souris est mise à mort par exsanguination. Le cathéter carotidien est connecté à un système de circulation extérieure par des tuyaux reliés à un manomètre. La pression du manomètre est maintenue à 100 mmHg correspondant à la PAM de l'animal. Cela nous permet d'avoir une circulation constante du fixateur (solution de formaline 10 %, Sigma Aldrich) dans l'arbre vasculaire et de préserver la géométrie de l'artère. Après 2 heures de fixation sous la pression physiologique les vaisseaux (aorte thoracique et abdominale, les artères carotidiennes gauche et droite) sont prélevés, nettoyés des muscles, de la graisse et du tissu conjonctif et mises dans des cassettes et conservés dans une solution à 10% de formaline.

Pour les études biochimiques des vaisseaux sont prélevés sur la glace et conservés dans l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

Pour les études d'immunofluorescence les vaisseaux (aortes, carotides) sont prélevés sur la glace et fixés dans 4% du paraformaldéhyde (PFA) pendant 1 heure. Les tissus vasculaires sont incubées une nuit à 4°C dans une solution de sucrose à 20%, puis inclus dans l'O.C.T. (Embedding Matrix for Frozen Sections, CellPath) et congelés à la vapeur d'azote liquide et stockés à -80°C. Les coupes d'aortes et de carotides à 7 µm sont faites avec un cryostat et déposées sur les lames Polysine et congelées à -80°C.

### *III.5.2. Histomorphométrie carotidienne*

Après 48h de conservation dans le formol, les carotides subissent une série de bains d'alcool et de xylène permettant leur déshydratation et leur inclusion dans la paraffine :

- 3 bains de PBS de 1h
- Passage dans l'éthanol 50° (les artères peuvent être conservées ainsi plusieurs semaines).
- 4 bains d'alcool 80° de 10 min
- 4 bains d'alcool 95° de 20 min.
- 5 bains d'alcool absolu de 20 min
- 2 bains de xylène de 30 min
- Passage de 15-20 min en paraffine liquide (55°, dans l'étuve)
- Laisser les prélèvements 1 nuit en paraffine chaude (55°) avant d'inclure, c'est-à-dire placer le prélèvement dans la position voulue dans un moule en métal, et laisser se solidifier la paraffine à 4° avant de démouler.

Les blocs de paraffine sont coupés en sections de 5 µm d'épaisseur avec un microtome. Les coupes de carotides à 5 µm sont déposées sur les lames Polysine puis déparaffinées (2 bains de xylène de 5 min, 1 bain d'alcool absolu de 5 min, 1 bain d'alcool 70° de 5 min) et réhydratées (1 bain d'eau distillée de 5 min).

### *III.5.3. Méthode de Weigert/Orcéine*

C'est une coloration élective des fibres élastiques par le réactif de Weigert et Orcéine : solution de résorcine et de fuschine précipitée par le perchlorure de fer. Une contre-coloration au picro-indigo carmin (méthode de Van Gieson) est également effectuée.

- Orcéine selon Weigert (résorcine/fuchsine solution) 10min
- Eau courante 1 min
- Solution de Weigert 5 min
- Eau courante
- Eau distillée
- Picro-indigo carmin l0 min
- Eau courante
- Alcool 70° 5 min
- Alcool 95° 5 min
- Alcool 100° - 5 min
- Xylène – 2 bains 5 min

- Monter à l'Eukitt (Klinder GMBH Co)

Cette coloration permet la quantification de l'épaisseur et de la MCSA qui est définie manuellement entre la limitante élastique interne et la limitante élastique externe selon la structure anatomique d'artère.

### *III.5.4. Méthode de Rouge Sirius*

Le Rouge Sirius (Direct Red 80, Sigma Aldrich 3655 48-5G) colore toutes les fibres de collagène :

- Solution de Rouge Sirius 0,1% dans acide picrique 1h 30 min
- Eau acétifiée à 0,5% - 2 bains 3 sec
- Eau distillée – 2 bains 1 min
- Sécher à l'air
- Alcool 70° - 5 min
- Alcool 90° - 5 min
- Alcool 100° - 5 min
- Xylène – 2 bains 5 min
- Monter à l'Eukitt

Les images sont obtenues par le microscope Nikon Diaphot 300. Les mesures de surface de média et le contenu en collagène ont été réalisés avec le logiciel NIS-Elements BR 3.2 (Nikon corp.).

### *III.5.5. Immunohistochimie*

Les marquages ont été réalisés sur des coupes de 5µm des aortes fixées au formol et incluses en paraffine. Un démasquage des antigènes est réalisé avec la procédure suivante :

1 - Chauffage dans autoclave à 110°C pendant 10 min dans sodium citrate pH 6.1

2 - Refroidissement à la température ambiante

3 - Traitement par la trypsine dans du $CaCl_2$ (0,1g de trypsine (Sigma Aldrich) dans 100 ml de $CaCl_2$ 0,4% dans un bain marine 37°C pendant 10-15 min)

4 - Lavage TBST 1X - 5 min

Les peroxydases endogènes sont détruites par incubation pendant 30 min dans une solution à 1% de $H_2O_2$. Les réactions non spécifiques sont bloquées par l'incubation dans la BSA 5% pendant 30 min.

Les coupes sont incubées avec les anticorps (AC) primaires pendant la nuit dans une chambre humide à 4°C. Les AC primaires sont dilués dans du TBS - BSA 1% : anti-$\alpha_v$-intègrine (sc-6617-R, Santa Cruz) 1:100 ; anti-collagène 1A1 (sc-8784, Santa Cruz) 1:100 ; anti-collagène 1A2 (sc-393573, Santa Cruz) 1:100 ; anti-collagène 3A1 (sc-28888, Santa Cruz) 1:100 ; anti-TGF-β1 (sc-146, Santa Cruz) 1:100 ; anti-cellular fibronectine (sc-59826, Santa Cruz) 1:50 et anti-SMMHC (ab125884, Abcam) 1:1000.

Après le lavage avec du TBST 1X les coupes sont incubées 1 heure à température ambiante avec les AC secondaires anti-souris F(ab')2 (E0413, Dako) et anti-lapin (E0432, Dako) dilués en 1:200 dans la solution de TBS - BSA 1%.

Un complexe streptavidine-peroxydase est incubé 30 min à température ambiante. La révélation est effectuée par incubation de DAB (SK-4100, Vector). La réaction est stoppée dans de l'eau distillée. Les lames sont déshydratées et montées dans le milieu Eukitt. Le contenu de chaque antigène est mesuré par le pourcentage de couleur définie qui a été quantifié à l'intérieur de région d'intérêt (ROI) de la média avec le logiciel NIS-Elements BR 3.2 (Nikon corp.).

### *III.5.6. Immunofluorescence*

Les marquages ont été réalisés sur des coupes de 5µm des aortes fixées au paraformaldéhyde incluses dans le l'OCT et conservées jusqu'à utilisation à -80°C. Les coupes sont rincées avec du PBS. Les réactions non spécifiques sont bloquées par l'incubation dans une solution de blocage (5% de sérum normal d'âne dans du PBS) pendant 30 min dans une chambre humide.

Les coupes sont incubées avec les AC primaires pendant une nuit dans une chambre humide à 4°C. Les AC primaires sont dilués dans la solution de PBST - BSA 1% : anti-vimentine (ab92547, Abcam) 1:200 ; anti-fibronectine (F3648, Sigma Aldrich) 1:200 ; anti-laminine (Z 0097, Dako) 1:100 ; anti-intégrine $\alpha_v$ (ab125684, Abcam) 1:50 ; anti-E-cadherine (10874-1-AP, ProteinTech) 1:50 ; anti-αSMA-Cy3 (C6198, Sigma Aldrich) 1:400 ; anti-SMMHC (ab125884, Abcam) 1:300 et anti-smootheline (sc-28562, Santa Cruz) 1:100.

Après trois lavages avec du PBS les coupes sont incubées pendant 1 heure dans une chambre humide à température ambiante avec des AC secondaires (Invitrogen, Abcam) à une dilution 1:500 dans la solution de PBST - BSA 1% et avec du DAPI (D8417, Sigma Aldrich) en dilution 1µg/ml pour un marquage nucléaire.

Les coupes sont lavées dans du PBS et montées dans le milieu Mowiol (Fluoromount Aqueous Mounting Medium, F4680, Sigma). Les images sont obtenues en microscopie

confocale (Leica TCS SP5 X AOBS monté sur DMI6000) et analysées avec le logiciel LAS-AF (Leica).

### *III.5.7. Mesure du collagène total par microscopie multiphotonique SHG*

#### *III.5.7.1. Fluorescence sous excitation biphotonique*

Afin de confirmer nos résultats d'histologie et d'immunohistochimie et visualiser la matrice de collagène sur les échantillons non colorés nous avons utilisé la microscopie multiphotonique de la génération seconde harmonique (SHG). La microscopie de fluorescence (1PEF : single photon excitation fluorescence, Figure 20) est basée sur l'absorption d'un photon dont l'énergie va faire passer la molécule de fluorophore de son état fondamental (S0) à un état électronique excité d'énergie supérieure (S1). Etant excitée, la molécule se relaxe spontanément vers son niveau fondamental (S0) en passant par le plan vibrationnel. Ce retour s'accompagne par l'émission d'un photon de fluorescence. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité du faisceau excitateur et à la concentration locale de fluorophores.

Dans le cadre de la fluorescence sous excitation biphotonique (2PEF - Figure 20), deux photons au lieu d'un seul sont absorbés quasi simultanément par la molécule, chacun des deux photons apportant la moitié d'énergie nécessaire à la transition électronique. L'absorption biphotonique reste peu efficace par son faible rendement quantique, nécessite une très haute densité spatiale en photons et oblige à concentrer l'énergie temporellement, pour augmenter l'intensité du signal en conservant une puissance moyenne biocompatible avec les échantillons utilisés, pour éviter phototoxicité.

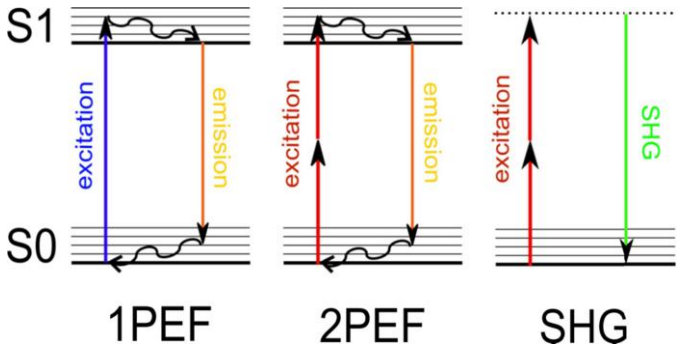



**Fig. 20**. **Schéma des différents processus de fluorescence et du genèse d'harmoniques**

Les photons sont responsables au bruit de fond et la dégradation d'image la plus prononcée dépend d'émission photonique dispersée. En microscopie confocale en mode multiphoton les photons provenant d'autres plans peuvent être sélectionnés par le diaphragme confocal ce que permet une meilleure pénétration dans les tissus avec une résolution 3D satisfaisante (Centonze et White 1998).

### *III.5.7.2. Génération de seconde harmonique*

La microscopie multiphotonique à SHG a émergé comme une modalité puissante pour l'imagerie de collagène fibrillaire dans une gamme variée de tissus (Werkmeister *et al*. 2010). A la place d'être adsorbée par la molécule, des photons émanant du faisceau d'excitation sont dispersés par un processus de conversion haut harmonique. La technique SHG est non invasive et basée sur l'excitation biphotonique et sur le processus de diffusion généré par des structures spécifiques. Elle permet la pénétration suffisante des tissus pour visualisation du collagène sans coloration ou marquage exogène (Zipfel *et al*. 2003 ; Werkmeister *et al*. 2008) et est très sensible à la structure fibrillaire du collagène et aux changements qui se produisent dans la fibrose et maladies du tissu conjonctif. L'arrangement fibrillaire spécifique de molécules du collagène type I-III, leurs domaines en triple hélice et liaisons peptidiques sur toute la longueur de fibres sont à l'origine du signal SHG très fort dans la MEC (Werkmeister *et al*. 2007; Dumas *et al*. 2010). Le signal SHG n'a été jamais détecté du collagène type IV, des fibres d'élastine ou d'autres composantes de la MEC comme fibronectine et laminine (Zipfel *et al*. 2003). La spécificité importante de cette technique pour le collagène fibrillaire de type I–III, la robustesse du signal par rapport à la diffusion et son caractère quantitatif sont très avantageux par rapport à la microscopie optique classique.

### *III.5.7.3. Matériel technique et montage expérimental*

Dans nos études le signal SHG du collagène total a été mesuré sur les coupes paraffines transversales non colorées d'artère carotidienne (épaisseur 16 μm) de souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ non traitées et après le traitement par la dose forte d'Ang II. L'objectif utilisé est un grossissement x10 (Leica HC PL FLUOTAR x 10/0.30, immersion d'eau) avec une ouverture numérique de 0.3. Le signal SHG a été mesuré à 800 nm a la moitie de la longueur d'onde d'excitation ($\lambda/2$ = 400 nm) à l'aide d'un MacroMultiphoton (SP5-CFS, Leica Microsystems) spécialement adapté au PTIBC-IBISA Nancy FR3209-IMOPA (Brevet WO 2012160312 A3) pour générer des images SHG de matrice 512×512 pixels (1 pixel = 1,80701 μm) à la fréquence de balayage 100 Hz. Le zoom numérique (déclaré au logiciel Leica LAS-AF) est fixé à ×16. La quantification du signal SHG a été normalisée au nombre de pixels contenu dans les ROIs pour obtenir un niveau de gris moyen par pixel. Les ROIs de la média carotidienne ont été choisi par la méthode manuelle basée sur la segmentation anatomique. Les mesures du signal SHG sont faites sur les images RGB quantifiées en niveaux de gris par la relation suivante : Gray = (0.299 × red) + (0.587 × green) + (0.114 × blue). Au final, le signal SHG quantifié (moyen de gris par pixel), pour chaque pixel, sur 256 niveaux de gris.

### III.6 Western Blot

Les protéines ont été obtenues par extraction dans un tampon de lyse [20 mmol/L Tris–HCl (pH = 7.6), 20 mmol/L MOPS, 2 mmol/L EGTA, 5 mmol/L EDTA, 30 mmol/L NaF, 40 mmol/L b-glycerophosphate, 20 mmol/L $Na_4P_2O_7$ (sodium pyrophosphate), 1 mmol/L $Na_3VO_4$ (sodium orthovanadate), 1 mmol/L PMSF, 0.5% Nonidet P-40] contenant des inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Roche).

La concentration en protéine a été déterminée par colorimétrie en utilisant le BSA protein assay reagent (Bio-Rad 500-0116). 20 µg de protéines sont séparées par électrophorèse en SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfert Pack 170-4159).

Après blocage des sites non spécifiques dans du TBST – BSA 5 % les membranes sont incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les AC primaires dilués dans du TBST – BSA 1% (Tableau 1).

Après lavages les membranes sont incubées 1h à température ambiante sous agitation avec l'AC secondaire approprié couplé à la peroxydase à température ambiante et sous agitation. L'activité de peroxydase est révélée par chimioluminescence avec le kit Bio-Rad (Clarity™ Western ECL Substrate 170-5060). La révélation est détectée et les images traitées au LAS-4000, Fuji, puis quantifiées par le logiciel Multi Gauge.

**Tableau 1. Les AC primaires utilisés dans l'étude Western Blot**

| Antigène | Référence d'AC | Fournisseur | Dilution |
|---|---|---|---|
| pFAK | Y576/Y577 CST 3281S | Cell Signaling | 1:300 |
| FAK | CST 3285 | Cell Signaling | 1:500 |
| pSrc | Y416 CST 2113S | Cell Signaling | 1:500 |
| Src | CST 2108S | Cell Signaling | 1:500 |
| pERK1/2 | T202/Y204 | Cell Signaling | 1:1000 |
| ERK1/2 | T202/Y204 | Cell Signaling | 1:1000 |
| pAkt | T308 244F9 | Cell Signaling | 1:500 |
| Akt | T308 9272 | Cell Signaling | 1:500 |
| Vinculine | CST 4650S | Cell Signaling | 1:400 |
| Vimentine | ab92547 | Abcam | 1:200 |
| Collagène type 1A1 | sc-8784 | Santa Cruz | 1:300 |
| Fibronectine cellulaire | F3648 | Sigma Aldrich | 1:500 |
| Laminine | Z 0097 | Dako | 1:1000 |
| Intégrine $\alpha_v$ | sc-6617 | Santa Cruz | 1:500 |
| Taline | 8d4 T3287 | Sigma Aldrich | 1:300 |
| E-cadherine | 10874-1-AP | ProteinTech | 1:500 |
| SMMHC | ab125884 | Abcam | 1:1000 |
| Smootheline | sc-28562 | Santa Cruz | 1:200 |
| GAPDH | sc25778 | Santa Cruz | 1:500 |

### III.7. Quantification de l'expression de gènes par PCR : extraction des ARN et réaction de PCR quantitative en temps réel (PCRq)

Les ARN totaux ont été extraits des carotides et des aortes en utilisant le réactif TRI (Sigma) et ont été transcrit avec le kit « high capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems) et des hexamères aléatoires pour générer des ADNc. L'analyse par qPCR a ensuite été réalisée avec la technologie PCR vert SYBR (Roche). Le programme Primer3 (de frodo.wi.mit.edu/primer3/) a été utilisé pour sélectionner des amorces (disponibles sur demande). La GAPDH a été utilisée comme gène de référence.

### III.8. Analyse statistique

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Un ANOVA à deux facteurs ou à un facteur a été réalisé pour les comparaisons multigroupes suivi d'un test post hoc Fisher's LSD pour les analyses intergroupes. Les comparaisons entre 2 groupes ont été analysées en utilisant le T Test (Student) non-apparié. Un trend ANOVA a été réalisé afin d'analyser l'effet dose de l'AngII. L'analyse statistique a été réalisée avec les logiciels Microsoft Excel et NCSS. Les valeurs de $P$ <0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

# RESULTATS

## I. Rôle du récepteur minéralocorticoïde des cellules du muscle lisse dans le tonus vasculaire

Nous avons comparé les aortes thoraciques des souris contrôles (CTL) et invalidées pour le MR ($MR^{SMKO}$) dans les CMLVs avec endothélium intact (CTL+E, $MR^{SMKO}$+E) et après dé-endothélisation mécanique (CTL-E, $MR^{SMKO}$-E).

Dans les anneaux avec l'endothélium intact, il n'y a pas de différence de contraction induite à la Phe entre les souris CTL et $MR^{SMKO}$. L'absence d'endothélium conduit à une augmentation des valeurs de Emax et pD2 en réponse à la Phe dans les deux phénotypes (Figure 21A, Tableau 2). La dé-endothélialisation augmente la sensibilité à la Phe de manière similaire dans les deux gènotypes de souris.

Pour tester la contraction agoniste-indépendant, nous avons analysé la réponse contractile au KCl (Figure 1B) et au $Ca^{2+}$ (Figure 1C). En réponse au KCl, la contraction maximale est plus faible chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris CTL dans les anneaux intacts. Cette différence est maintenue après suppression de l'endothélium (Figure 21B, Tableau 2).

En réponse au $Ca^{2+}$ la contraction maximale est plus faible chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris dans les anneaux avec endothèlium intact ou déendothélialisés (Figure 21C, Tableau 2).

La contraction induite par la caféine qui est liée à la liberation du $Ca^{2+}$ intracellulaire sarcoplasmique est identique entre les souris CTL et $MR^{SMKO}$ : 5,02 ± 0,46 chez les souris CTL et 4,48 ± 0,36 chez les $MR^{SMKO}$ (Figure 21D) ce qui suggère que le $Ca^{2+}$ intracellulaire n'est pas impliqué. Ces résultats nous permettent de proposer que l'invalidation du MR est associée à une altération de la réponse au $Ca^{2+}$ extracellulaire.

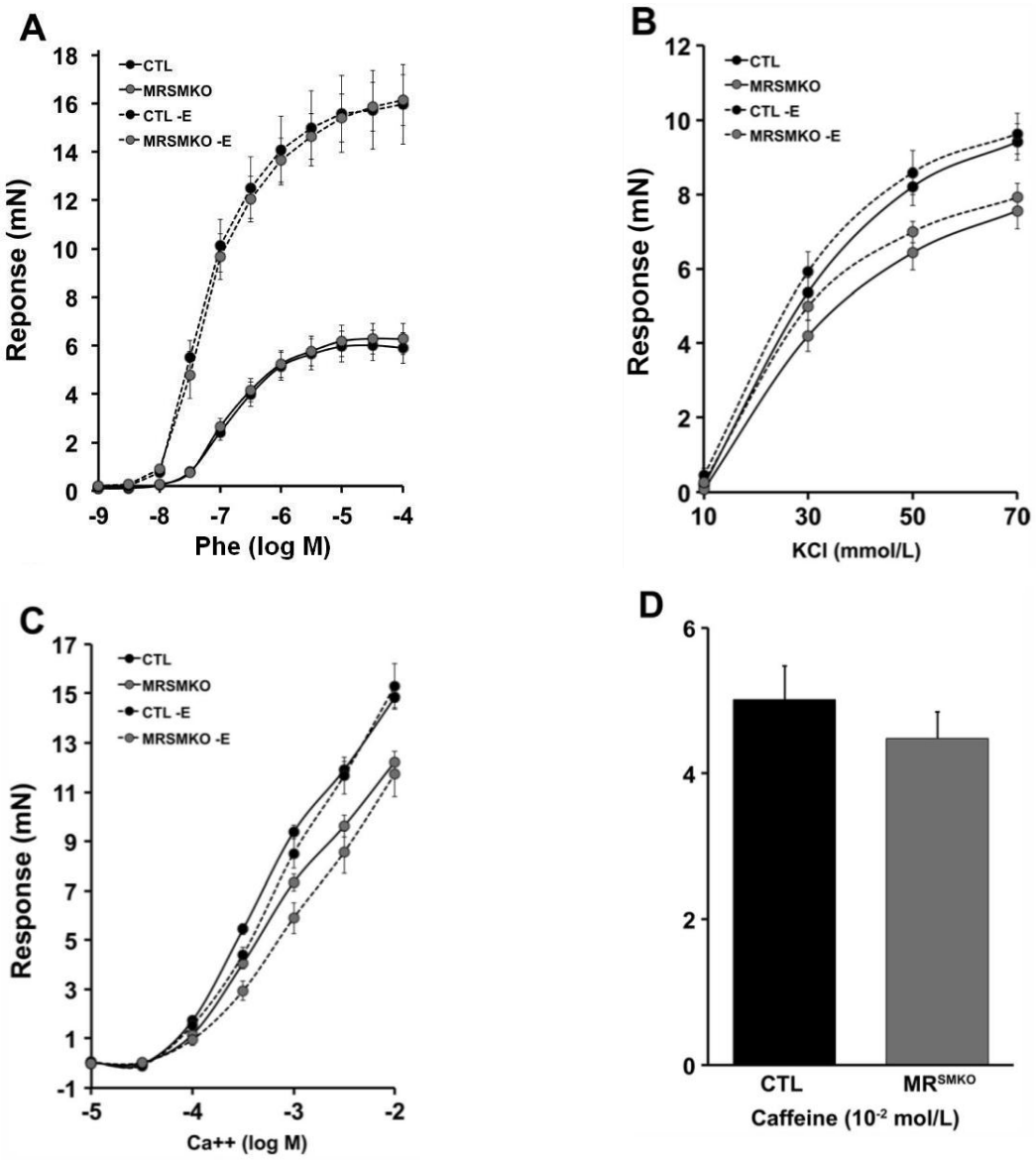



**Fig. 21. Contraction vasculaire dans les aortes des souris CTL et $MR^{SMKO}$ :**
**A** – courbes dose-réponse à la phényléphrine (Phe) chez les souris CTL+E (n = 17), $MR^{SMKO}$+E (n = 15), CTL-E (n = 5) et $MR^{SMKO}$-E (n = 5) ; **B** - courbes dose-réponse au KCl chez les souris CTL+E (n = 5), $MR^{SMKO}$+E (n = 5), CTL-E (n = 5) et $MR^{SMKO}$-E (n = 5) ; **C** - courbes dose-réponse au $Ca^{2+}$ chez les souris CTL+E (n = 10), $MR^{SMKO}$+E (n = 10), CTL-E (n = 5) et $MR^{SMKO}$-E (n = 5) ; **D** – contraction induite par une dose unique de caféine ($10^{-2}$ M) chez les souris CTL (n = 5) et $MR^{SMKO}$ (n = 5).
+E - endothélium intact, -E – sans endothélium, CTL souris contrôles, $MR^{SMKO}$ souris invalidées pour le MR dans les CMLVs.
Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (t test non apparié).

En présence d'endothélium intact, la relaxation aortique induite par l'Ach est identique dans les deux groupes de souris (Figure 22A).

Il n'y a pas de différence de relaxation induite par l'Ach en présence de l'inhibiteur de la NO-synthase L-NNA entre les souris CTL et $MR^{SMKO}$ (Figure 22B). En revanche, la vasodilatation NO-dépendante induite par l'Ach en présence d'indométhacine est significativement diminuée chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris CTL (Figure 22B, Tableau 2).

En l'absence d'endothélium, la relaxation induite par le SNP (donneur du NO) est significativement diminuée chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris CTL (Figure 22C, Tableau 2), alors qu'il n'y a pas de différence de vasorelaxation entre les deux groupes de souris (CTL et $MR^{SMKO}$) après l'utilisation de l'analogue de PGI2 tréprostinil (Figure 22C). L'inhibition de la voie cyclo-oxygénase a démasqué la diminution de la relaxation.

Pour tester la sensibilité des CMLVs au cGMP la relaxation NO-dépéndante induite par un analogue synthétique de cGMP 8-Br-GMPc (Figure 22D) a été étudiée avec les anneaux aortiques dé-endothélialisés chez les souris CTL et $MR^{SMKO}$. La relaxation est similaire dans les deux génotypes.

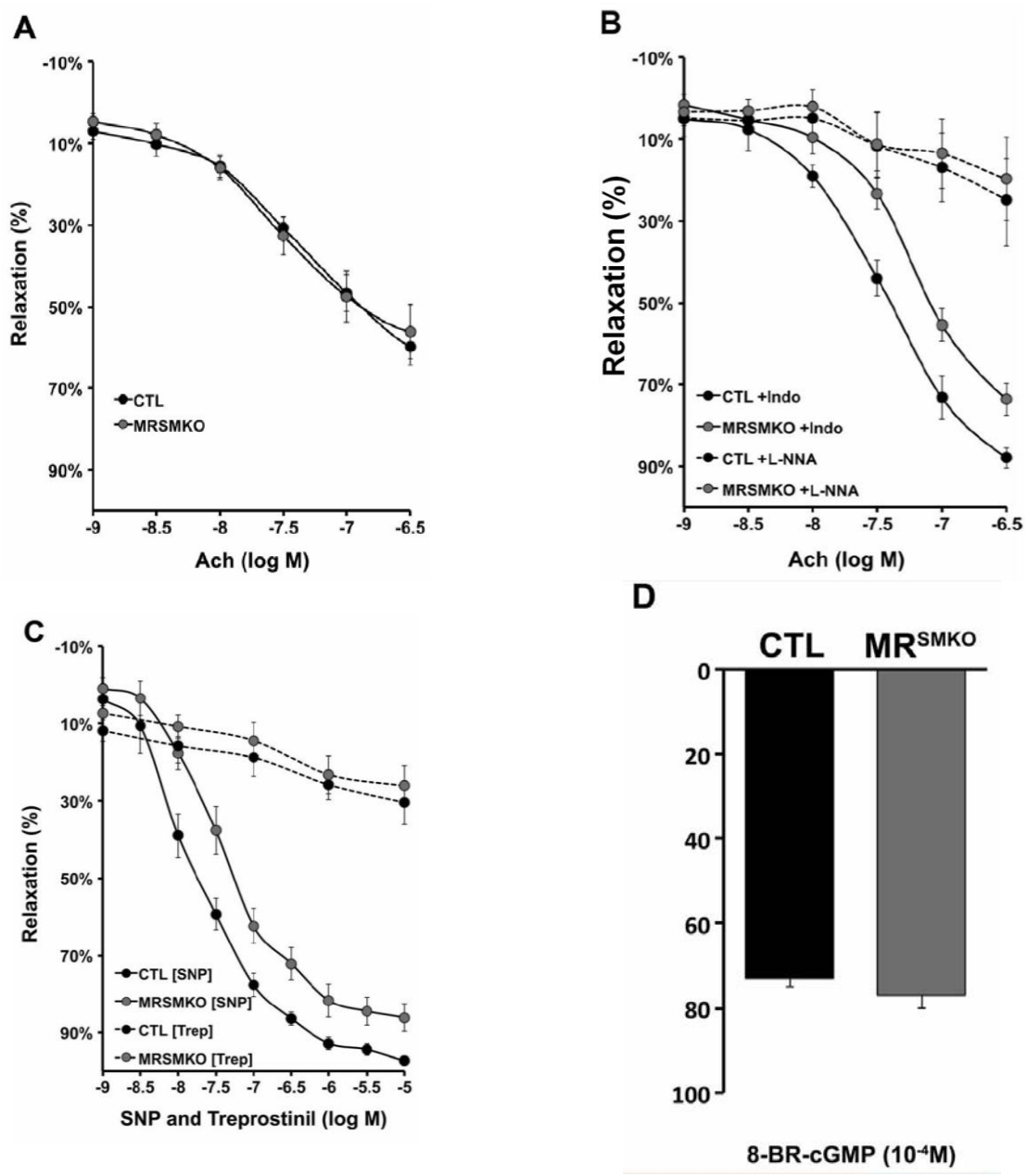



**Fig. 22. Relaxation vasculaire dans les aortes des souris CTL et MR$^{SMKO}$ :** **A** - courbes dose-réponse à l'acétylcholine (Ach) chez les souris CTL (n = 13) et MR$^{SMKO}$ (n = 10); **B** - courbes dose-réponse à l'acétylcholine, en présence d'indométhacine (Indo) chez les souris CTL + Indo (n = 5) et MR$^{SMKO}$ + Indo (n = 5) et en présence de L-NNA chez les souris CTL + L-NNA (n = 5) et MR$^{SMKO}$ + L-NNA (n = 6) ; **C** – courbes dose-réponse au SNP chez les souris CTL-E (n = 5) et MR$^{SMKO}$-E (n = 5) et courbes dose-réponse au tréprostinil chez les souris CTL-E (n = 6) et MR$^{SMKO}$-E (n = 5) ; **D** - relaxation endothélium-indépendante en réponse au 8-bromo-cyclique GMP ($10^{-4}$ mol/L) chez les souris CTL-E (n = 4) et MR$^{SMKO}$-E (n = 4).
+E - endothélium intact, -E – sans endothélium, CTL souris contrôles, MR$^{SMKO}$ souris invalidées pour le MR dans les CMLVs.
Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (t test non apparié).

**Tableau 2. Réactivité vasculaire dans les aortes des souris CTL et $MR^{SMKO}$**

| | | | CTL+E | $MR^{SMKO}$ +E | CTL-E | $MR^{SMKO}$ -E | CTL+E + L-NNA | $MR^{SMKO}$+E +L-NNA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Contraction** | **Phe** | **Nb** | 17 | 15 | 5 | 5 | - | - |
| | | **Emax (mN)** | 6 ± 0,7 | 6,2 ± 0,6 | 15,8 ± 1,7# | 15,9 ± 1,1# | - | - |
| | | **pD2** | −6,7 ±0,1 | −6,7 ± 0,0 | −7,2 ± 0,0 | −7,1 ± 0,1 | - | - |
| | **KCl** | **Nb souris** | 5 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| | | **Emax (mN)** | 9,4 ± 0,5 | 7,6 ± 0,5* | 9,6 ± 0,6 | 7,9 ± 0,4* | - | - |
| | | **pD2** | -1,6 ± 0,0 | -1,6 ± 0,0 | -1,6 ± 0,0 | -1,6 ± 0,0 | - | - |
| | **$Ca^{2+}$** | **Nb souris** | 10 | 10 | 5 | 5 | - | - |
| | | **Emax (mN)** | 14,8 ±0,4 | 12,2 ± 0,5* | 15,3 ± 0,9 | 11,7 ± 0,9* | - | - |
| | | **pD2** | −3,2±0,02 | −3,2 ± 0,02* | −3,1±0,02 # | −3 ± 0,03*# | - | - |
| **Relaxation** | | | **CTL+E** | **$MR^{SMKO}$ +E** | **CTL+E+ Indo** | **$MR^{SMKO}$+E+ Indo** | **CTL+E+ L-NNA** | **$MR^{SMKO}$+E +L-NNA** |
| | **Ach** | **Nb souris** | 13 | 10 | 5 | 5 | 5 | 6 |
| | | **Emax (%)** | 60 ± 5 | 61 ± 6 | 96 ± 2 | 83 ± 2° | 24 ± 6# | 24 ± 10# |
| | | **pD2** | −7,7 ±0,1 | −7,7 ± 0,1 | −7,4 ± 0,1 | −7,2 ± 0,1° | −7,4 ± 0,2 | −7,4 ± 0,2 |
| | | | **SNP** | | **Tréprostinil** | | **8-Br-cGMP** | |
| | | | **CTL-E** | **$MR^{SMKO}$ -E** | **CTL-E** | **$MR^{SMKO}$ -E** | **CTL-E** | **$MR^{SMKO}$ -E** |
| | | **Nb souris** | 5 | 5 | 6 | 5 | 4 | 4 |
| | | **Emax (%)** | 97 ± 1 | 86 ± 4* | 34 ± 5 | 27 ± 5 | 73 ± 2 | 77 ± 3 |
| | | **pD2** | −7,7 ±0,1 | −7,3 ± 0,1* | −7,2 ± 0,3 | −7,2 ± 0,2 | - | - |

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; +E = endothélium intact ; −E = sans endothélium ; *P<0,05 *vs* souris CTL; #P<0,05 *vs* +E ou condition non traitée (CTL ou $MR^{SMKO}$ avec Ach seule *vs* CTL ou $MR^{SMKO}$ avec Ach + Indo ou *vs* CTL ou $MR^{SMKO}$ avec Ach +L-NNA); °P<0,05 *vs* souris CTL (t test non apparié).

## Conclusion

L'absence du récepteur minéralocorticoïde dans les CMLVs induit une diminution de la vasoconstriction en réponse au $Ca^{2+}$ extracellulaire chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris CTL sans altération du stockage et du transport du $Ca^{2+}$ intracellulaire. La relaxation induite par l'Ach en présence d'indométacine ou par le SNP est altérée, ce qui suggère une défaillance de la voie de signalisation du NO. La contraction musculaire dépend de la phosphorylation de la MLC et de la régulation par le MYPT1 (sous-unité regulatrice de la MLCP). L'altération de la réponse au $Ca^{2+}$ extracellulaire entraine une diminution de l'activité de MLCK qui effectue la phosphorylation de MLC. La diminution de la phosphorylation de MLC induit une diminution de la contraction des CMLVs. Chez les souris $MR^{SMKO}$ il y a une diminution de l'expression des formes phosphorylées de MLC, de MLCK et de MYPT1 ce qui peut expliquer l'altération du couplage contraction – relaxation.

La relaxation NO-dépéndante s'effectue par la production de cGMP qui participe à la déphosphorylation de la MLC et se traduit par la relaxation de muscle. La réponse vasodilatatrice insuffisante chez les souris $MR^{SMKO}$ en réponse à l'Ach lié à l'altération de la voie du NO et à la réduction de sa biodisponibilité. Le NO est synthétisé par la eNOS, donc la diminution de la vasorelaxation NO-dépendante induit une augmentation compensatoire de l'activité d'eNOS : l'expression de eNOS phosphorylée est augmentée avec une augmentation du ratio peNOS/eNOS chez les souris $MR^{SMKO}$.

## II. Rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines dans la rigidité et la fibrose vasculaire

### II.1. Invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ : souris $\alpha_v^{SMKO}$

Nous avons confirmé, par immunofluorescence et par RT-qPCR, l'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ dans les CMLVs des souris $\alpha_v^{SMKO}$ males et femelles deux semaines après induction au tamoxifène. La Figure 23A montre la présence de l'intégrine $\alpha_v$ dans les trois tuniques de la carotide chez les souris WT. Chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ la sous-unité $\alpha_v$ reste présente dans l'endothélium et l'adventice et n'est retrouvée que dans quelques cellules de la média. La quantification par RT-qPCR (Figure 23B) sur aorte totale montre un niveau d'expression diminué de 62% chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$.

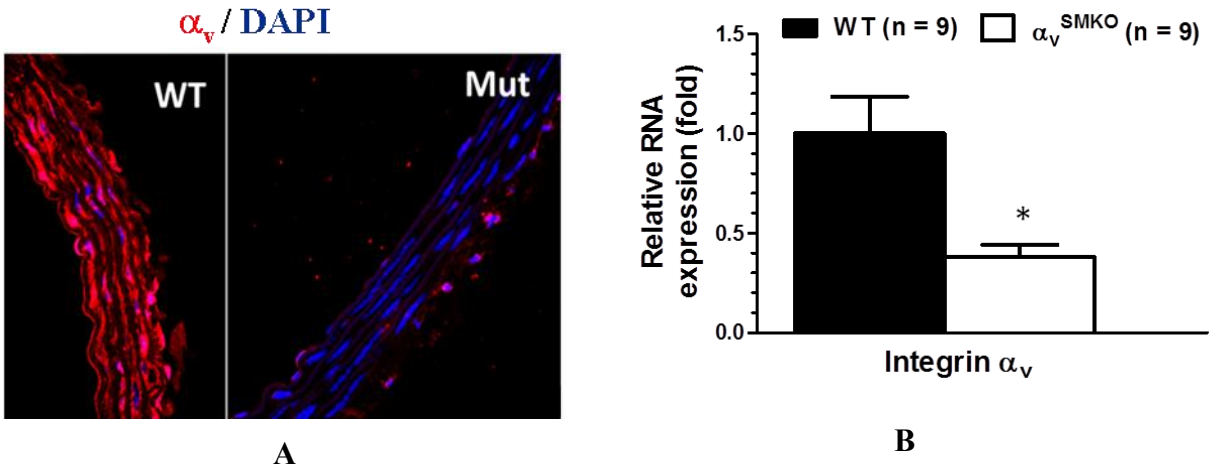



**Fig. 23. Invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ dans des CMLV chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ :**

**A** – Marquage par immunofluorescence dans la carotide : les images ont été réalisées avec un microscope (Leica SP5, France) rouge – intégrine $\alpha_v$, bleu - noyaux (objectif x40) ; **B** – Expression relative par RT-qPCR des ARNmde l'intégrine av dans l'aorte : les valeurs sont calculées par rapport à l'expression de la GAPDH; n = nombre d'animaux. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* WT.

### II.2. Mesure de la pression artérielle des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ conscientes, avant et après traitement par l'Ang II

La PAS a été mesurée chez les animaux conscients avant et après traitement pendant 28 jours avec de l'Ang II à faible dose (0,3 mg/kg/jour) ou forte dose (1,5 mg/kg/jour) (Figure 24). Avant traitement il n'y a pas de différence de PAS entre les souris $\alpha_v^{SMKO}$ et WT (103 ± 1 *vs* 106 ± 1 mmHg). Après traitement, nous avons observé une augmentation significative de la pression artérielle dans les deux groupes de souris : 106 ± 1 *vs* 128 ± 8 mmHg chez les souris WT et 103 ± 1 *vs* 124 ± 8 mmHg chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ traitées par 0,3 mg/kg/jour d'Ang II; 106 ± 1 *vs* 135 ± 3 mmHg chez les WT et 103 ± 1 *vs* 134 ± 3 mmHg chez les $\alpha_v^{SMKO}$ traitées

par 1,5 mg/kg/jour d'Ang II. Cette augmentation de PAS est identique et dose dépendante dans les deux groupes de souris (trend ANOVA, p<0.05).

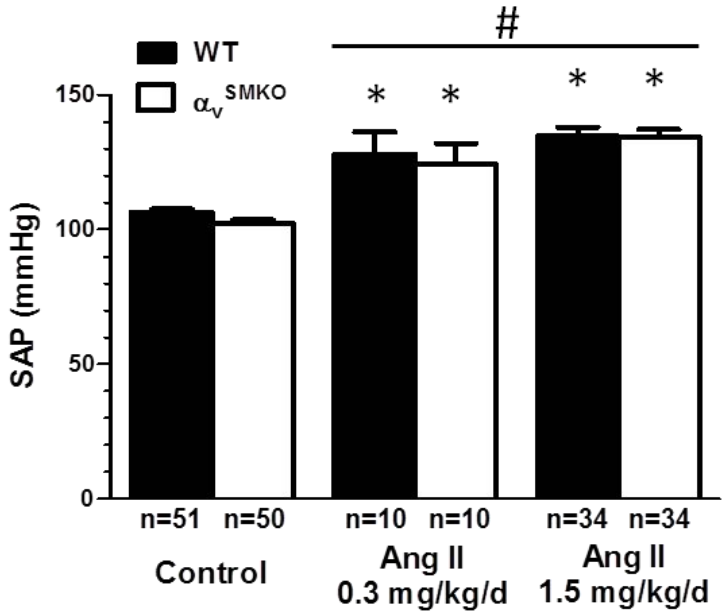



**Fig. 24. PAS des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ conscientes avant et après le traitement à l'Ang II**.
La PAS a été mesurée chez les animaux conscients par pléthysmographie.
n = nombre d'animaux.
Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. *P<0,05 *vs* contrôles dans la même souche ; #P<0,05 (trend ANOVA).

*L'Ang II induit une augmentation de la PAS dose-dépendante et équivalente dans les deux groupes de souris.*

## II.3. Etude de la rigidité artérielle chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ en absence et après traitement à l'Ang II

### *II.3.1. Mesures de l'épaisseur de la média et de la MCSA sur coupes fixées à pression physiologique*

L'épaisseur de la média et la MCSA ont été mesurées sur les carotides après coloration des lames élastiques à l'orcéine (Tableau 3, Figure 25). En absence de traitement à l'Ang II il n'y a pas de différence d'épaisseur de la média et de MCSA entre les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$.

Après traitement à l'Ang II, nous avons mis en évidence une augmentation dose-dépendante de l'épaisseur de la média. Cette augmentation est significative aux deux doses chez les souris WT et ne devient significative qu'à 1,5 mg/kg/jour d'AngII chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ par rapport aux souris non traitées.

Après traitement à l'Ang II, nous avons également mis en évidence une augmentation dose-dépendante de la MSCA carotidienne. Cette augmentation est significative à 1,5 mg/kg/jour d'AngII chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ sans différence entre les deux génotypes. Au niveau des valeurs absolues cette augmentation est plus exprimée chez les souris WT que chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ (Tableau 3).

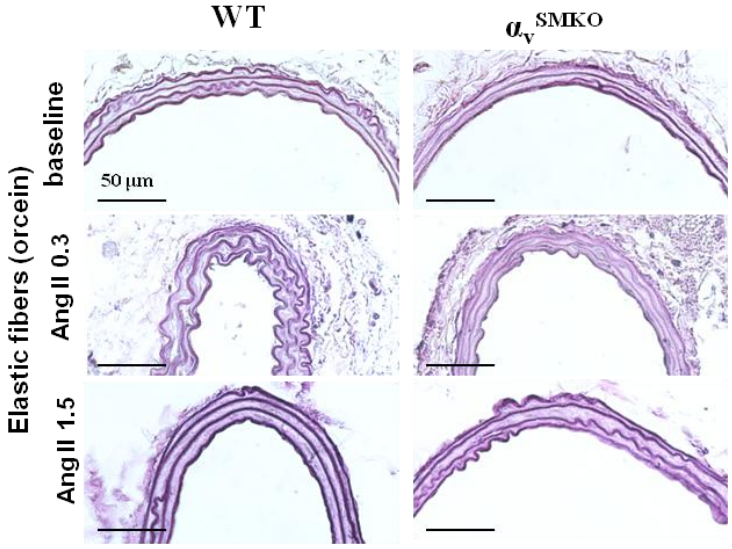



**Fig. 25. Structure de l'artère carotide chez les souris WT et $a_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II.**
Marquage des fibres élastiques par coloration à l'orcéine (objectif x40).

*En absence de traitement à l'AngII la structure de la paroi artérielle des souris $\alpha_v^{SMKO}$ est identique à celle des souris WT (épaisseur de la média et MCSA identiques). Après traitement à l'AngII nous avons observé une hypertrophie de la paroi dose-dépendante chez les souris WT, et les chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$.*

### *II.3.2. Etude des propriétés mécaniques artérielles : échotracking de l'artère carotide*

Les souris $\alpha_v^{SMKO}$ ont une distensibilité carotidienne à la PAM plus élévée que les souris WT (13,3 ± 0,7 *vs* 10,3 ± 0,6 $mmHg^{-1}$ $.10^{-3}$ p=0,002 ; Tableau 3) sans modification de la PA, du diamètre ou du module élastique.

Après traitement à l'Ang II, nous confirmons l'augmentation de PA chez les animaux anesthésiés dans les deux groupes comparés aux souris sans traitement à l'Ang II (Tableau 3). Chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ traitées avec 0,3 mg/kg/jour d'Ang II, la PAD et la PAM sont augmentées de manière significative. Après traitement à l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour nous avons observé une augmentation significative de la PAS, la PAD et la PAM (Tableau 3).

Apres le traitement par une faible dose d'Ang II (0,3 mg/kg/jour) la distensibilité mesurée dans la variation de la PA au range commun entre les 80 et 92 kPa est augmentée

uniquement chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ par rapport aux souris WT (12,1 ± 0,2 *vs* 8,5 ± 0,3 $mmHg^{-1}.10^{-3}$) avec un déplacement de la courbe distensibilité-pression vers la haut par rapport aux autres groupes des souris (souris WT traitées et les deux groupes de souris non traitées - Figure 26A). Cette variation de la PA entre les 80 et 92 kPa a été choisie pour les mesures de la distensibilité (MDist) et le diamètre carotidien moyen (MDia) car dans cet intervalle nous pouvons tracer des courbes et mesurer la distensibilité, et le diamètre pour toutes les 6 groupes de souris étudiées. En revanche, la forte dose d'Ang II (1,5 mg/kg/jour) diminue la distensibilité dans les deux groupes de souris traitées comparée à celle des souris sans traitement ou avec traitement par la faible dose d'Ang II (Figure 26B). Le déplacement de la courbe distensibilité-pression vers la haut se traduit par la moindre rigidité artérielle. A l'inverse, le déplacement de cette courbe vers le bas montre une rigidité augmentée.

Après traitement à l'Ang II avec 0,3 mg/kg/jour nous avons observé une tendance à la diminution du module élastique uniquement chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$. La courbe Einc-wall stress est légèrement décalée à droite (Figure 26C) chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ traitées par rapport aux souris non traitées. Le Wall stress moyen a été mesuré pour la variation au range commun entre les 600 et 850 kPa, car dans cet intervalle nous pouvons également tracer des courbes Einc-Wall stress pour toutes les 6 groupes de souris étudiées. Le déplacement de la courbe se traduit par l'augmentation du $WS_{600\text{-}850}$ (329±19 kPa vs 279±12 chez les $\alpha_v^{SMKO}$ non traitées ; $P<0.05$). Une diminution du module élastique avec une augmentation du Wall stress et le déplacement de la courbe Einc-wall stress vers la droite se traduit par la moindre rigidité artérielle.

Après traitement à l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour nous avons mis en évidence une augmentation significative du module élastique chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ avec le déplacement de la courbe Einc-wall stress vers la gauche, ce qui exprime la rigidité élevée. Cette augmentation est similaire dans les deux groupes de souris (Tableau 3 ; Figure 26D).

**Tableau 3 : Paramètres carotidiens mesurés chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ anesthésiées**

| | WT | | | $\alpha v^{SMKO}$ | | | ANOVA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Contrôle** | **Ang II 0,3 mg/kg/j** | **Ang II 1,5 mg/kg/j** | **Contrôle** | **Ang II 0,3 mg/kg/j** | **Ang II 1,5 mg/kg/j** | **Effet gène** | **Effet AngII** | **Interaction** |
| **Nb de souris** | 18 | 7 | 9 | 12 | 5 | 8 | | | |
| **PAS (mmHg)** | 102 ± 2 | 102 ± 3 | 116 ± 5* | 93 ± 2 | 107 ± 2 | 112 ± 5* | 0,31 | <0,001 | 0,43 |
| **PAD (mmHg)** | 70 ± 2 | 67 ± 3 | 75 ± 4* | 59 ± 2 | 74 ± 3* | 80 ± 3* | 0,60 | <0,001 | 0,04 |
| **PAM (mmHg)** | 81 ± 2 | 79 ± 3 | 88 ± 4* | 71 ± 2 | 85 ± 3* | 90 ± 3* | 0,45 | <0,001 | 0,10 |
| **PP (mmHg)** | 32 ± 2 | 35 ± 3 | 41 ± 2 | 34 ± 2 | 34 ± 1 | 33 ± 3 | 0,30 | 0,38 | 0,31 |
| **Diamètre à PAM (mm)** | 0,51 ± 0,01 | 0,57 ± 0,01 | 0,60 ± 0,04 | 0,52 ± 0,02 | 0,54 ± 0,03 | 0,58 ± 0,02 | 0,04 | 0,21 | 0,42 |
| **Distensibilité à PAM ($mmHg^{-1}.10^{-3}$)** | 10,3 ± 0,6 | 10,7 ± 1,0 | 4,6 ± 0,4*§ | 13,3 ± 0,7# | 12,4 ± 1,2 | 4,4 ± 0,4*§ | 0,002 | <0,001 | 0,23 |
| **Paramètres au range commun** | | | | | | | | | |
| **$MDia_{80-92}$ (mm)** | 0,52 ± 0,01 | 0,59 ± 0,01 | 0,59 ± 0,04 | 0,56 ± 0,02 | 0,54 ± 0,02 | 0,57 ± 0,02 | 0,48 | 0,15 | 0,14 |
| **$MDist_{80-92}$ ($mmHg^{-1}.10^{-3}$)** | 9,2 ± 0,5 | 8,5 ± 0,3 | 5,05 ± 0,2*§ | 7,6 ± 0,4 | 12,1 ± 0,2* | 4,9 ± 0,3*§ | 0,10 | <0,001 | <0,001 |
| **$MWS_{600-850}$ (kPa)** | 296 ± 11 | 297 ± 10 | 192 ± 15*§ | 279 ± 12 | 329 ± 17* | 181 ± 9*§ | 0,91 | <0,001 | 0,21 |
| **Epaisseur (µm)** | 16,3 ± 0,7 | 22 ± 1,1* | 27,9 ± 1,9*§ | 15,7 ± 0,6 | 19,7 ± 1,4 | 23,6 ± 1,5* | 0,02 | <0,001 | 0,24 |
| **MCSA à PAM ($\mu m^2$)** | 21 ± 1 | 23 ± 2 | 35 ± 3*§ | 21 ± 1 | 23 ± 2 | 29 ± 2*§ | 0,3 | <0,001 | 0,24 |

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. MDia – diamètre moyen, MDist - distensibilité moyenne, MWS – Wall Stress moyen : ces paramètres sont calculés en variation du range commun pour toutes les 6 groupes de souris. *P<0,05 *vs* contrôles dans la même souche ; #P<0,05 *vs* WT avec le même traitement; §P<0,05 *vs* traitement à 0,3 mg/kg/j d'AngII dans la même souche.

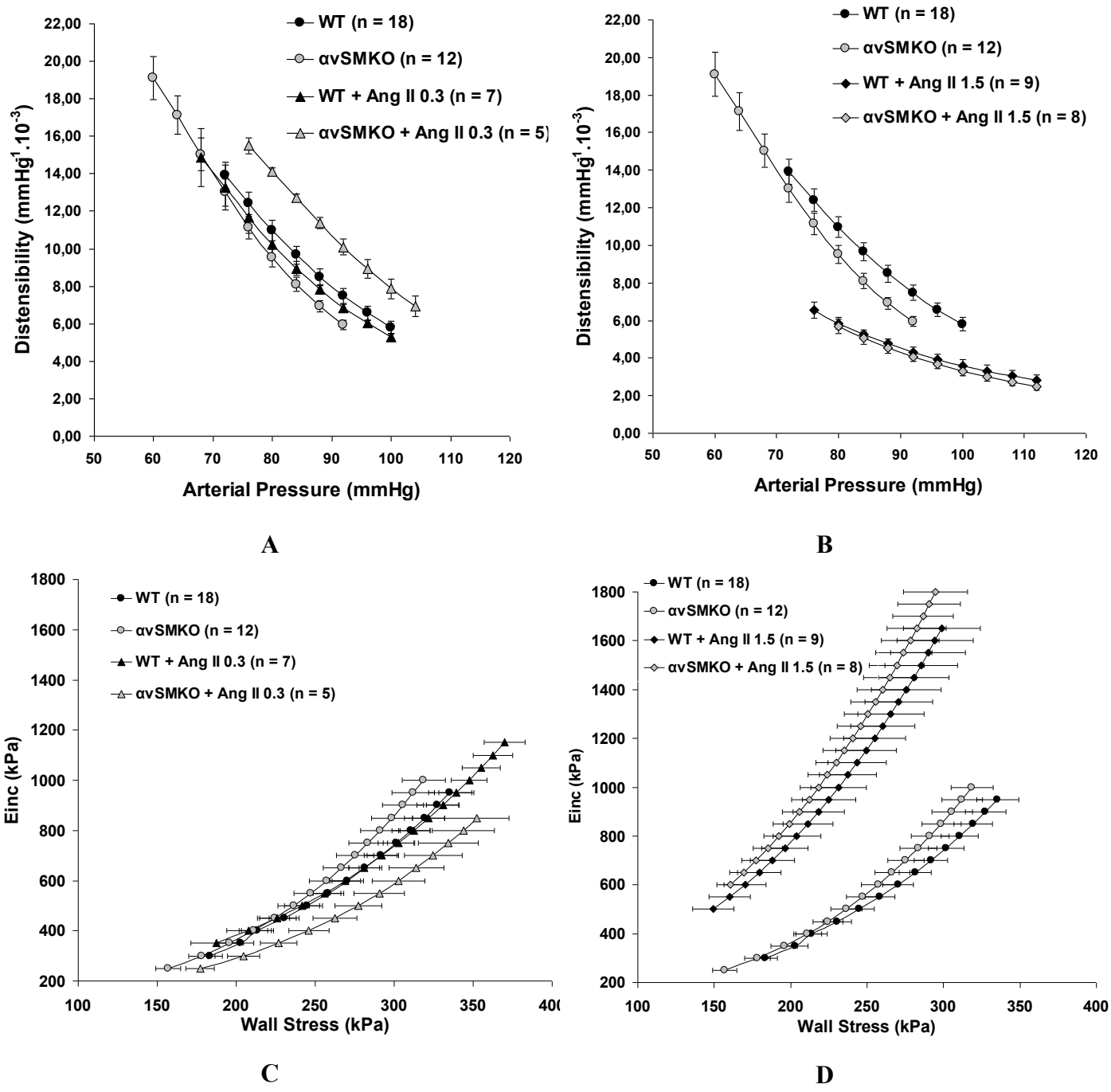



**Fig. 26. Distensibilité et module élastique (courbe Einc/WS) de l'artère carotide des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II**
**A – B** courbes distensibilité-pression : souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ non traitées et après AngII : **A -** 0,3 mg/kg/jour d'AngII ; **B** - 1,5 mg/kg/jour d'AngII
**C - D** courbes Einc-Wall stress : souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ non traitées et après AngII : **A -** 0,3 mg/kg/jour d'AngII; **B -** 1,5 mg/kg/jour d'AngII.
n = nombre d'animaux ; Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM.

*Par rapport aux souris WT, les souris $\alpha_v^{SMKO}$ ont le même niveau basal de PA mais elles presentent une distensibilité carotidienne à PAM plus elevée. Nous avons montré qu'une dose submaximale d'Ang II (0,3 mg/kg/jour) augmente la distensibilité et diminue la rigidité*

*(Einc) uniquement chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$. En revanche, en réponse à une forte dose d'AngII (1,5 mg/kg/jour) les carotides des souris $\alpha_v^{SMKO}$ se comportent comme celles des WT avec une diminution de la distensibilité et une augmentation de la rigidité (Einc).*

## II.4. Etude de la fibrose dans la paroi artérielle des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal ou après traitement à l'Ang II

### *II.4.1. Mesure du collagène total dans la média carotidienne*

#### *II.4.1.1. Mesure du collagène total par coloration au Rouge Sirius*

Aucune différence significative de la densité de collagène n'a été observée à l'état basal entre les deux groupes de souris étudiés : 25,5 ± 0,3 (WT) *vs* 26,3 ± 0,4% ($\alpha_v^{SMKO}$).

Le traitement par l'AngII induit une augmentation dose-dépendante de la densité de collagène dans les deux groupes de souris par rapport aux souris non traitées (Trend ANOVA $p<0.01$). Cette augmentation est significativement plus importante chez les animaux traités avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II par rapport aux animaux traités avec 0,3 mg/kg/jour d'Ang II (35,5 ± 0,6 vs 29,6 ± 0,5 chez les souris WT ; $p<0.01$ et 30,3 ± 0,6 *vs* 27,8 ± 0,5 chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ ; $p=0.03$). L'augmentation de la densité de collagène en réponse au traitement par l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour est moindre chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ (30,3 ± 0,6% chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ *vs* 35,5 ± 0,6% chez les souris WT ; $p<0.01$; Fig. 27A-B).

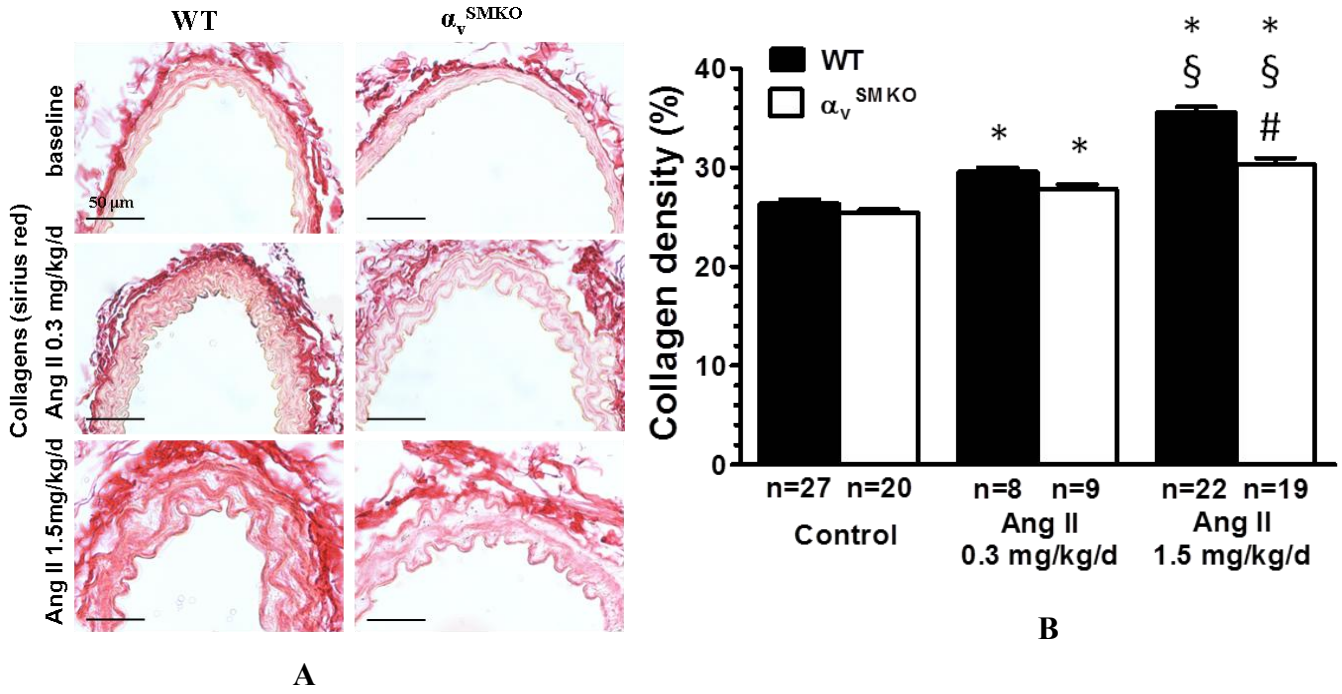



**Fig. 27. Détection du collagène total dans l'artère carotidienne des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II :**
**A** – marquage des fibres du collagène par coloration au Rouge Sirius (objectif x40) ;
**B** – ratio de la densité de collagène par rapport à la surface totale de la média: N= nombre d'animaux ; Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* animaux non traités dans la même souche ; #P<0,05 *vs* WT avec le même traitement; §P<0,05 traitement à 0,3 *vs* 1,5 mg/kg/jour d'Ang II dans la même souche.

### *II.4.1.2. Mesure du collagène fibrillaire par microscopie multiphotonique à génération de seconde harmonique (SHG)*

Nous avons également utilisé la microscopie multiphotonique à génération de seconde harmonique (SHG) pour mesurer la fluorescence intrinsèque associée au collagène total (Figure 28A). Les résultats obtenus confirment ceux trouvés par coloration au Rouge Sirius : les souris $\alpha_v^{SMKO}$ ont moins de collagène fibrillaire que les souris WT.

Ces mesures ont été faites en absence de traitement à l'AngII ou présence d'un traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'AngII. En absence de traitement il n'y a pas de différence de signal SHG par le collagène dans la média carotidienne chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ par rapport aux souris WT: 8,6 ± 2 *vs* 7,5 ± 1,1 moyenne de gris/pixel (Figure 28B).

Chez les animaux traités avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II, nous avons montré une augmentation du signal SHG chez les souris WT et pas d'augmentation chez les $\alpha_v^{SMKO}$ (Figure 28A-B).

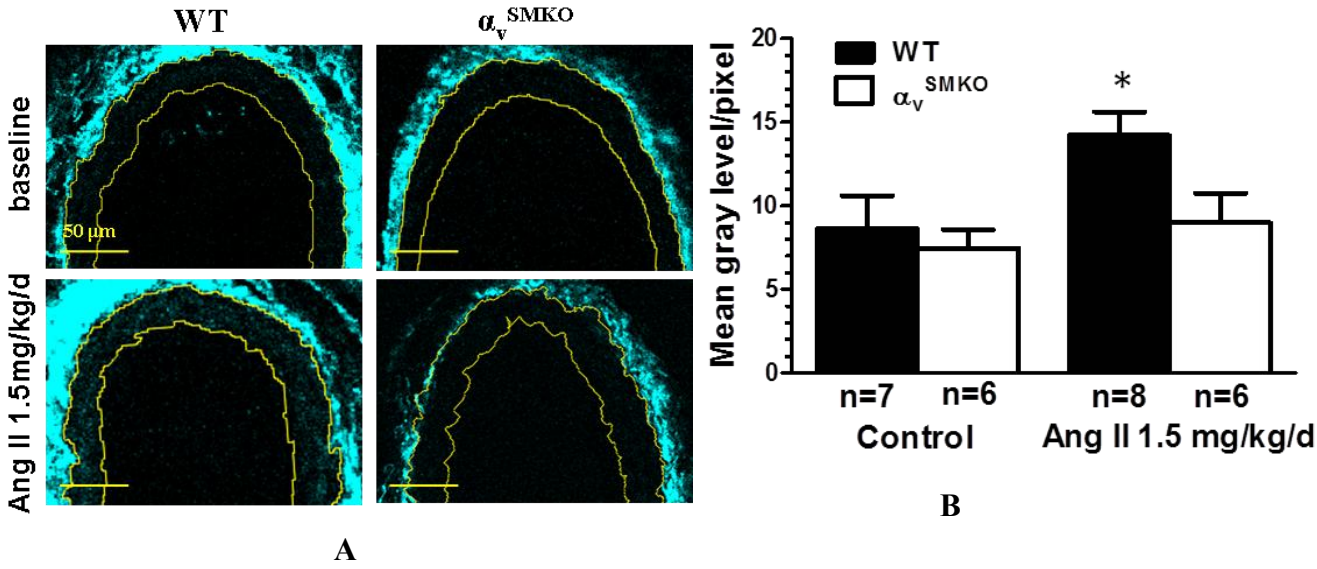



**Fig. 28. Détection du collagène total dans l'artère carotidienne des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II :**
**A** – signal SHG par le collagène total par la microscopie multiphoton SHG chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ non traitées et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II ;
**B** – ratio du signal SHG par le collagène par rapport à la surface totale de la média :
n = nombre d'animaux ; Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* animaux non traités dans la même souche.

### *II.4.1.3. Mesures dans des protéines associées à la fibrose la média carotidienne par immunohistochimie*

L'analyse des marqueurs de fibrose a été réalisée en immunohistochimie sur les carotides des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal ou après traitement par l'Ang II à 1,5 mg/kg/jour. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4 et la Figure 29.

Le traitement par l'Ang II induit une augmentation significative de l'expression de la sous-unité $\alpha_v$ chez les souris WT et chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$.

En absence de traitement par l'AngII les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ ont des niveaux similaires d'expression de différentes chaines de collagène (1A1, 1A2, 3A1), de fibronectine et de TGFβ1. Après traitement par l'Ang II nous avons mis en évidence, pour les chaines de collagène étudiées (le collagène 1A1, 1A2 et 3A1) ainsi que pour la fibronectine et le TGFβ1, une augmentation significative de ces protéines dans les carotides des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$. Concernant la fibronectine et le Col1A1 cette augmentation est à une tendance à être plus importante dans le groupe WT comparé aux souris $\alpha_v^{SMKO}$ (Interaction : = 0.08 pour le Col1A1 et 0.13 pour la fibronectine). Cette augmentation est significativement plus importante pour le Col1A2, le Col3A1 et le TGFβ1 dans le groupe WT comparé aux souris $\alpha_v^{SMKO}$ (interaction : = 0.02 pour le Col1A2 ; 0.03 pour le Col3A1 et 0.04 pour le TGFβ1).

**Tableau 4 : Marqueurs de fibrose chez les souris WT et $\alpha v^{SMKO}$**

| | WT | | $\alpha_v^{SMKO}$ | | ANOVA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Contrôle** | **Ang II 1.5mg/kg/jour** | **Contrôle** | **Ang II 1.5mg/kg/jour** | **Effet gène** | **Effet Ang** | **Interaction** |
| | **7** | **9** | **8** | **8** | | | |
| Col1A1 | 36,2 ± 4,1 | 57,7±3,5* | 29,5±3,4 | 38,6±3# | <0,001 | <0,001 | 0,08 |
| Col1A2 | 32,1±1,6 | 60,2±3,5* | 31,4±2,3 | 45,9±2,4* # | 0,01 | <0,001 | 0,02 |
| Col3A1 | 32,5±1,3 | 55,6±3,4* | 30,4±2,7 | 41,1±2,5*# | <0,001 | <0,001 | 0,03 |
| Fibronectine cellulaire | 27,6±3,9 | 52,0±4* | 25,1±2,5 | 39,3±1,8* # | 0,03 | <0,001 | 0,13 |
| TGF-β | 43,5±4 | 68,1±2,3* | 31,2±2,4 | 43,5±3,5* # | <0,001 | <0,001 | 0,04 |
| SM-MHC | 56,6±1,3 | 66,0±1,8* | 42,6±3,9# | 57,9±2,8* # | <0,001 | <0,001 | 0,26 |
| Intégrine $\alpha_v$ | 57,2±2,8 | 64,6±2,9 (p=0,07) | 31,9±2,9# | 47,6±4* # | <0,001 | <0,001 | 0,2 |

% de la densité de chaque marqueur par rapport à la surface totale de la média. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* contrôles dans la même souche ; #P<0,05 *vs* WT avec le même traitement.

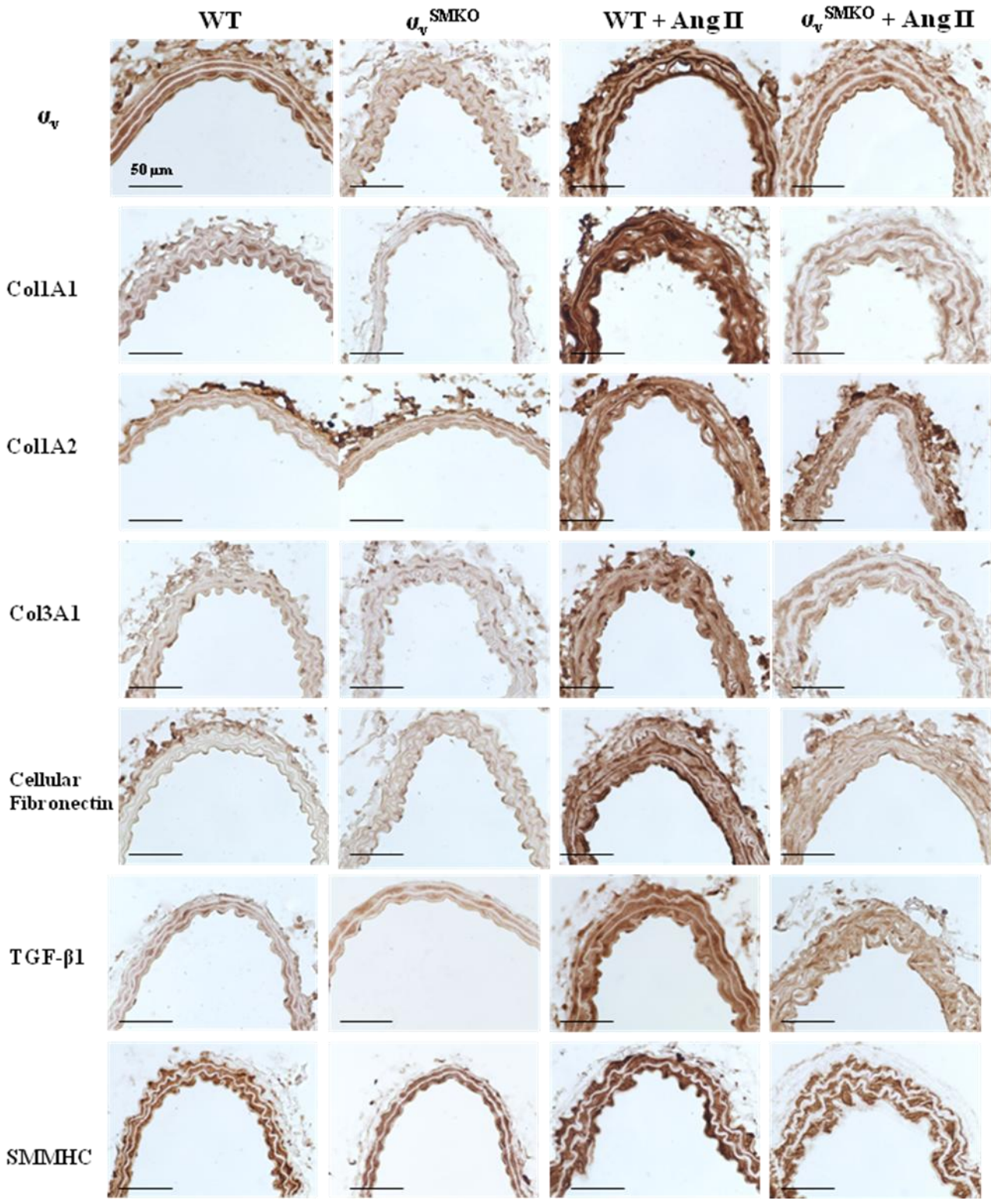



**Fig. 29. Immunohistochimie des marqueurs de fibrose dans l'artère carotide chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II** (objectif x40).

En absence de traitement par l'AngII les CMLVs de souris $\alpha_v^{SMKO}$ expriment moins la SMMHC que celles des souris WT. Après traitement à l'Ang II nous avons mesuré une augmentation de la SMMHC dans les deux groupes. L'expression de la SMMHC reste

significativement moins importante chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ comparée aux souris WT (P<0.001)

*En abscence de traitement à l'AngII les souris $\alpha_v^{SMKO}$ et WT ont une expression similaire des principales protéines matricielles (Col1A1, Col1A2, Col3A1, fibronectine). En réponse à l'Ang II, nous avons montré par détection du collagène total (Rouge Sirius et SHG) et également des 3 principaux types de collagènes vasculaires (Col1A1, Col1A2, Col3A1 par immunomarquage), une réponse fibrotique significativement plus faible chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ comparées aux souris WT. Cette diminution de la fibrose est aussi retrouvée pour la fibronectine et le TGF-β.*

### II.5. Etude des voies de signalisation de l'intégrine $\alpha_v$ chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement à l'Ang II

Nous avons étudié par Western Blot les principales protéines (formes natives et activées) impliquées dans les voies de signalisation de l'intégrine $\alpha_v$ : la taline (Figure 30), Src, FAK et Akt (Figure 31) chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après traitement par l'AngII avec 1,5 mg/kg/jour.

Les résultats obtenus montrent, qu'il n'y a pas de différence significative pour la taline, FAK, Src et Akt entre les deux groupes de souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ avec ou sans traitement à l'Ang II (Figure 30 A-B, Figure 31 A-B).

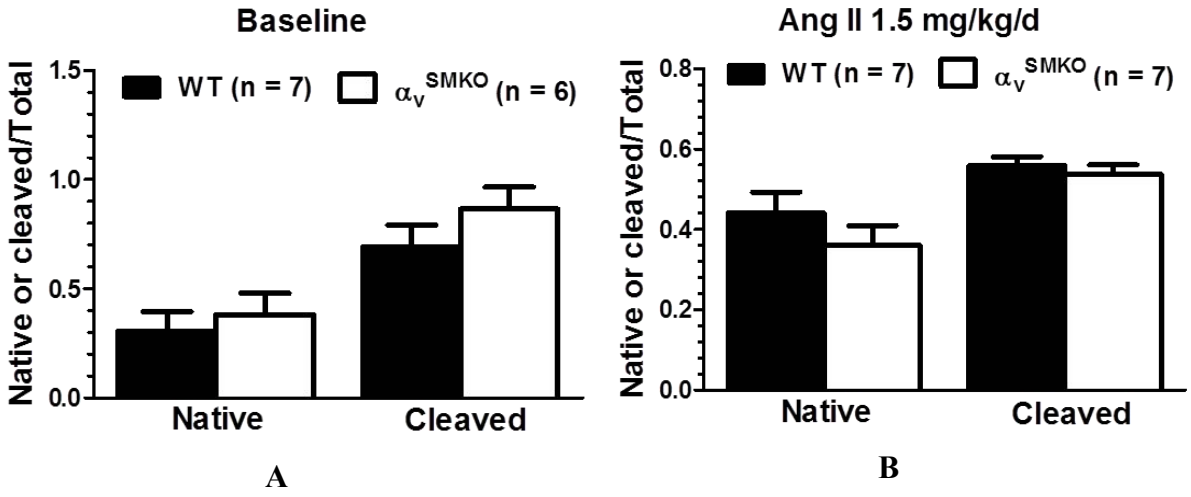



**Fig. 30. Expression de taline dans les aortes des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ au niveau de base et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II :**
**A - B** : Quantification des western blot : rapport protéine native ou clivée/protéine totale : **A** - à l'état basal ; **B** - après 1,5mg/kg/jour d'AngII.
n = nombre d'animaux ; le taux d'expression de protéine totale chez les souris WT est mis à 1. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM.

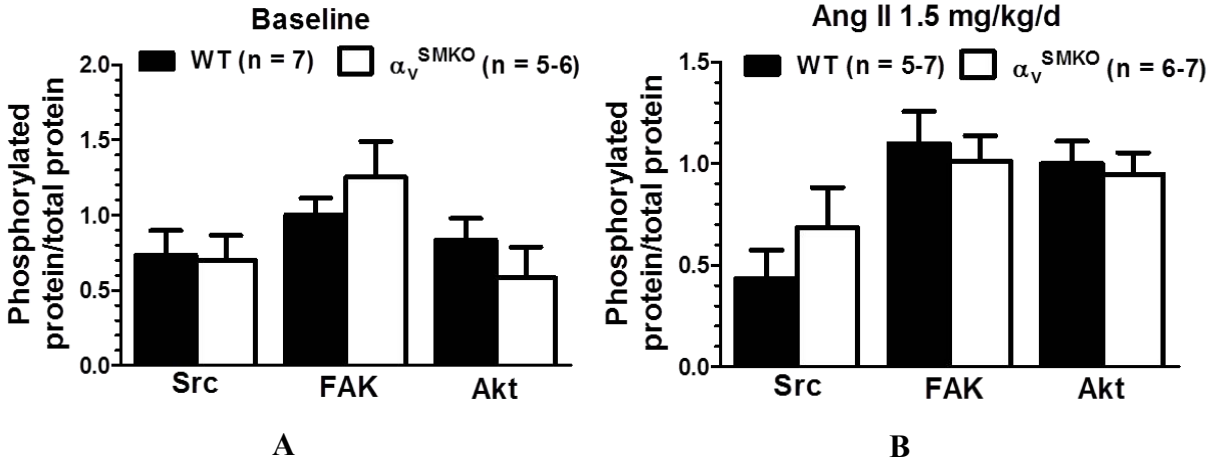



**Fig. 31. Expression de Src, de FAK et d'Akt dans les aortes des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ au niveau de base et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'Ang II :**
**A – B :** Quantification des westerns blot : rapport protéines phosphorylées/protéines totales: **A** - à l'état basal; **B** - après 1,5mg/kg/jour d'AngII.
n = nombre d'animaux. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM.

### II.6. Etude de la réactivité vasculaire *in vitro* chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal ou après traitement *in vivo* à l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour : contraction/relaxation des carotides isolées.

En réponse à la Phe, nous observons une augmentation du Emax chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ par rapport aux souris WT (Emax : 3,7 ± 0,5 *vs* 1,9 ± 0,3 mN, Figure 32A, Tableau 5) et aucune modification de la sensibilité (pD2). Le traitement avec l'Ang II induit une diminution significative de la contraction uniquement chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$, donc il n'y a plus de différence du Emax entre les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ après l'Ang II. Le traitement par l'AngII diminue égalemet la sensibilité (pD2) à la Phe (ANOVA effet AngII ; p=0.04) de façon similaire dans les deux groupes de souris (Figure 32A, Tableau 5).

La relaxation induite par le SNP est identique dans les deux groupes de souris et elle n'est pas modifiée par le traitement à l'Ang II (Figure 32B, Tableau 5).

A l'état basal la relaxation induite par l'Ach est similaire chez les $\alpha_v^{SMKO}$ et les souris WT (Figure 32C, Tableau 6). Le traitement *in vivo* par l'Ang II ne modifie pas la relaxation induite par l'Ach chez les souris WT. En revanche, la relaxation induite par l'Ach est significativement diminuée chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ (diminution du Emax et augemntation du pD2 - Figure 32D, Tableau 6). La relaxation induite par l'Ach est très fortement diminuée en présence d'un inhibiteur de NO L-NAME 1($0^{-4}$ mol/L) dans les deux génotypes : Emax est 11,1 ± 5% chez les WT et 6,8 ± 2,7% chez les $\alpha_v^{SMKO}$. Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris traitées par l'Ang II sans diffé rence entre les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ (Figure 32C-D).

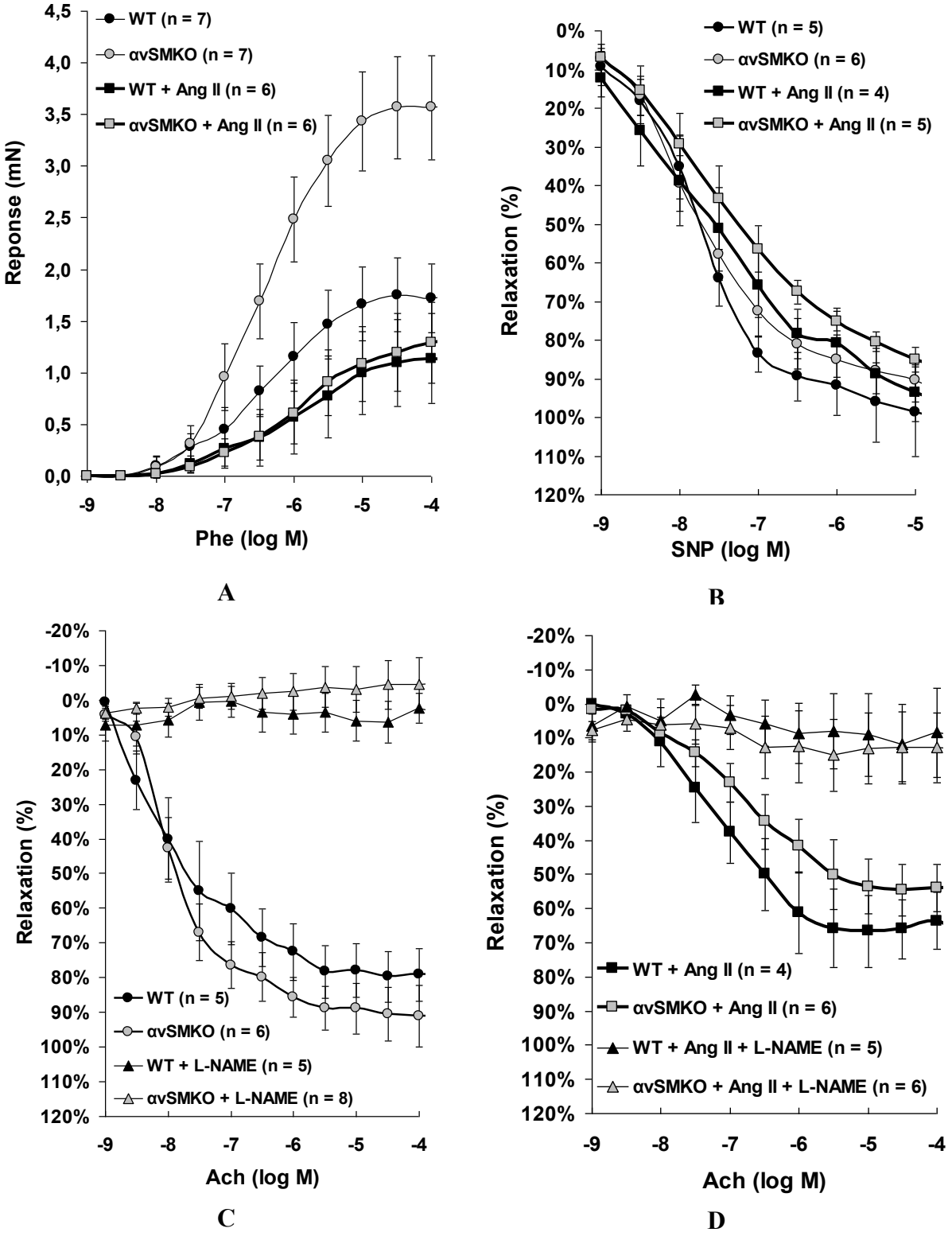



**Fig. 32. Réactivité vasculaire dans les carotides des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ à l'état basal et après l'Ang II avec 1,5 mg/kg/jour :**
**A** – courbes dose-réponse à la Phe ; **B** - courbes dose-réponse au SNP en présence d'Indo ; **C** - courbes dose-réponse à l'Ach en absence et en présence de L-NAME ; **D** - courbes dose-réponse à l'Ach après traitement *in vivo* à l'Ang II en absence et en présence de L-NAME.
n = nombre d'animaux. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM.

**Tableau 5 : Réactivité vasculaire dans les carotides des souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ en absence et après traitement avec 1,5 mg/kg/jour d'AngII**

| | | | WT | | $\alpha_v^{SMKO}$ | | ANOVA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Agoniste** | **Contrôle** | **AngII 1.5mg/kg/jours** | **Contrôle** | **AngII 1.5mg/kg/jours** | Effet gène | Effet AngII | Interaction |
| **Contraction** | **Phe** | **Nb de souris** | 7 | 6 | 7 | 6 | | | |
| | | **Emax (mN)** | 1,9 ± 0,3 | 1,2 ± 0,4 | 3,7 ± 0,5# | 1,3 ± 0,4* | 0,03 | <0,001 | 0,06 |
| | | **pD2** | -6,1 ± 0,2 | -5,8 ± 0,2 | -6,4 ± 0,2 | -5,9 ± 0,2 | 0,23 | 0,04 | 0,65 |
| **Relaxation** | **Ach** | **Nb de souris** | 5 | 4 | 6 | 6 | | | |
| | | **Emax (%)** | 80,9 ± 7,2 | 71,7 ± 11,6 | 93,9 ± 7,1 | 58,0 ± 8,0* | 0,96 | 0,01 | 0,12 |
| | | **pD2** | -7,7 ± 0,3 | -7,1 ± 0,2 | -7,8 ± 0,1 | -6,6 ± 0,2* | 0,42 | <0,001 | 0,28 |
| | **SNP** | **Nb de souris** | 5 | 4 | 6 | 5 | | | |
| | | **Emax (%))** | 104,3 ± 10,1 | 95,6 ± 6,0 | 90,5 ± 5,6 | 85,1 ± 3,3 | 0,09 | 0,31 | 0,81 |
| | | **pD2** | -7,7 ± 0,1 | -7,7 ± 0,3 | -7,7 ± 0,1 | -7,5 ± 0,2 | 0,30 | 0,21 | 0,15 |

(Emax) - la concentration en agoniste provoquant 50% des réponses maximales (EC50) ; pD2 - le logarithme négatif des valeurs d'EC50. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* contrôles dans la même souche ; #P<0,05 *vs* WT avec le même traitement.

Chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ dans les carotides sans traitement à l'AngII nous avons observé une augmentation de la réponse contractile à la Phe. Après traitement par l'Ang II (1,5 mg/kg/jour) la réponse contractile à la Phe diminue fortement chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ et revient au même niveau que chez les souris WT.

En présence d'un traitement à l'AngII, la relaxation induite par l'Ach dans les carotides des souris $\alpha_v^{SMKO}$ est alterée (diminution de l'Emax et du PD2) par rapport aux WT.

**Conclusion**

L'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ dans les CMLVs induit, au niveau carotidien, une augmentation de la distensibilité *in vivo* et de la contractilié *in vitro* à la Phe. Dans le modèle d'hypertension chronique et de fibrose artérielle induit par l'administration d'Ang II nous avons montré que l'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ protége les vaisseaux contre le développement de la fibrose : une même augmentation de la PA en réponse à l'AngII chez les souris WT et $\alpha_v^{SMKO}$ se traduit chez les souirs $\alpha_v^{SMKO}$ par une moindre réponse fibrotique de la paroi artérielle.

## III. Implication de la vimentine dans la rigidité artérielle

### III.1. Expression des protéines des filaments intermédiaires dans l'artère carotide

Nous avons étudié l'expression de la vimentine dans les carotides de souris adultes en Western blot et immunomarquage. Nous confirmons l'expression de la vimentine dans l'aorte et la carotide des souris CTL et son absence chez les souris invalidées pour la vimentine ($Vim^{-/-}$) (Figure 33 A-B). Nous avons réalisé des doubles marquages pour la vimentine et un marqueur spécifique des CMLVs (α-SMA) et/ou des cellules endothéliales (CD31- CE) : nos résultats montrent que la vimentine est présente dans les CMLVs et dans les CEs des souris contrôles (CTL) (Figure 33 C-D).

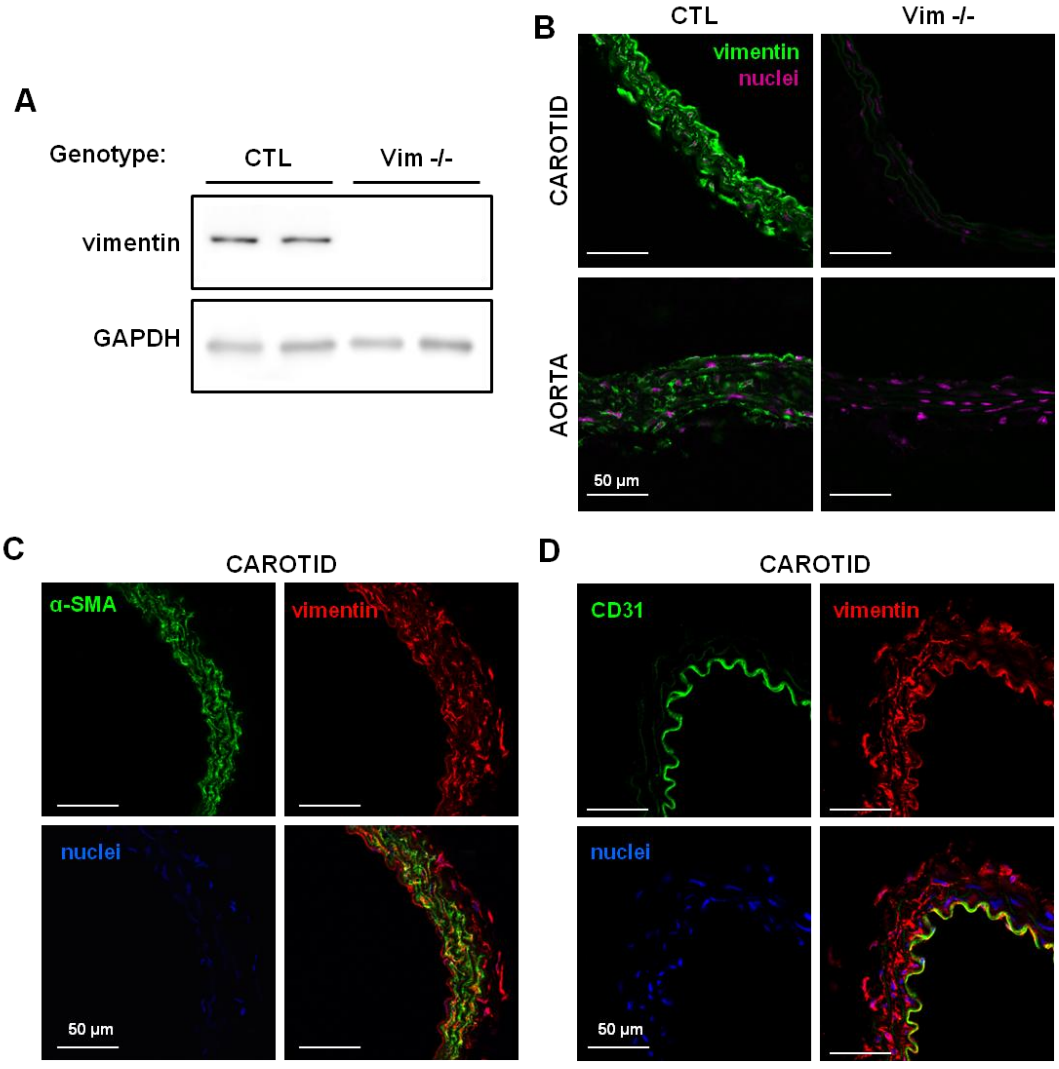



**Fig. 33. Expression de la vimentine chez les souris contrôles (CTL) et invalidées pour la vimentine ($Vim^{-/-}$) dans la paroi aortique et carotidienne : A -** Western Blot ; **B** - marquage par immunofluorescence : les images ont été réalisées avec un microscope (Zeiss SP5, France) (objectif x40). CTL : souris control, $Vim^{-/-}$ : souris KO pour la vimentine ; **C** - triple marquage : α-SMA (CMLV) ; vimentine ; DAPI ; **D** - triple marquage : CD31 (CE) (CMLV) ; vimentine ; DAPI ; **C-D** - la superposition des trois marqueurs montre, en jaune, une localisation de la vimentine dans lec CMLV (**C**) et dans les CE (**D**).

Les études précédentes ont montré que la synemine, autre membre de la famille des IF, est également présente dans les CMLVs et les CEs dans l'embryon de souris (Izmiryan *et al*. 2009). Dans les vaisseaux, sa présence dans les filaments est conditionnée par la présence de la vimentine mais pas de la desmine (Xue *et al*. 2004). Nous avons confirmé cette observation chez les souris adultes par immunofluorescence (Figure 34). Nous avons montré que la vimentine et la synemine sont présentes dans les carotides des souris CTL et invalidées pour la desmine ($Des^{-/-}$) : le marquage montre une colocalisation de la vimentine et de la synémine chez les souris CTL, et $Des^{-/-}$. Nous confirmons l'absence de synémine dans les souris KO pour la vimentine ($Vim^{-/-}$). En revanche, la vimentine est présente dans les souris synémine KO ($Syn^{-/-}$).

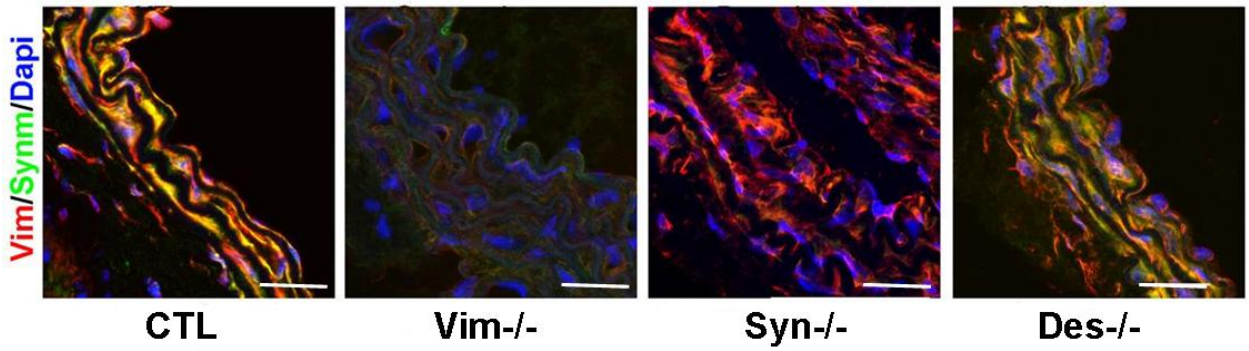



**Fig. 34. Expression des filaments intermédiares chez les souris invalidées pour la vimentine, la synémine ou la desmine.**
Marquage par immunofluorescence : les images ont été réalisées avec un microscope (Zeiss SP5, France), échelle = 25 µm. Vimentine (rouge) ; Synémine (vert) Noyeaux (bleu) ; Jaune (co-localisation Synémine-Vimentine).CTL : souris control ; $Vim^{-/-}$ : souris KO pour la vimentine ; $Syn^{-/-}$ : souris KO pour la synmémine ; $Des^{-/-}$ : souris KO pour la desmine.

## III.2. L'invalidation de la vimentine induit une augmentation de la rigidité artérielle

### *III.2.1. Mesure de la pression artérielle*

La pression artérielle chez les souris $Vim^{-/-}$ conscientes est significativement plus basse que celle des souris CTL : 91 ± 4 *vs* 111 ± 11 mmHg. En revanche il n'y a pas de différence entre les souris $Syn^{-/-}$ et les CTL : 107 ± 11 *vs* 111 ± 11 mmHg. Il n'y a également pas de différence entre les souris double KO ($Vim^{-/-}Syn^{-/-}$) et les CTL : 105 ± 14 *vs* 111 ± 11 mmHg (Tableau 6). Chez les animaux anesthésiés la diminution de pression artérielle (PAS, PAD et PAM) persiste chez les souris $Vim^{-/-}$.

### *III.2.2.Etude de la structure de la paroi artérielle chez les souris invalidées pour la vimentine et la symémine dans des CMLVs*

L'épaisseur et la MCSA de la media carotidienne sont identiques chez les souris $Vim^{-/-}$ et $Syn^{-/-}$ par rapport aux animaux CTL (Tableau 6). Une augmentation de la MCSA a été

mesurée chez les souris double KO Vim$^{-/-}$Syn$^{-/-}$ : 32 ± 1 *vs* 25 ± 2 µm$^2$ par rapport aux souris CTL (Tableau 6).

### *III.2.3. Mesure des propriétés mécaniques artérielles : échotracking de l'artère carotide*

Chez les souris Vim$^{-/-}$ la courbe pression-distensibilité est décalée vers le bas par rapport à la courbe de souris CTL (Figure 36A). La distensibilité dans un range commun de PAM (80-92 mmHg) est plus faible chez les souris Vim$^{-/-}$ comparées au CTL (12,2 ± 2 *vs* 6,0 ± 1). La courbe Einc-Wall Stress est decalée vers la gauche (Figure 36B) chez les souris Vim$^{-/-}$ comparée aux souirs CTL. Pour une même variation de module élastique (entre 400 et 800 kPa) le Wall Stress moyen est diminué chez les souris Vim$^{-/-}$ par rapport aux souris CTL : 256 ± 20 chez les CTL *vs* 194 ± 5 kPa chez les Vim$^{-/-}$ : il y a donc une augmentation de la rigidité artérielle chez les souris Vim$^{-/-}$. Les souris double KO Vim$^{-/-}$Syn$^{-/-}$ ont montrées des résultats identiques aux souris Vim$^{-/-}$, ce qui souligne l'importance de la vimentine dans le développement de la rigidité carotidienne. Il n'y a pas de modification chez les souris Syn$^{-/-}$ comparées aux souris CTL (Figure 35A-B, Tableau 6).

Ces résultats nous ont permis d'identifier le rôle de vimentine dans le développement de la rigidité artérielle. La diminution de la distensibilité et du Wall Stress de la carotide se traduisent par l'augmentation de la rigidité artérielle chez les souris Vim$^{-/-}$. En revanche l'absence de synémine ne modifie pas les propriétés mécaniques de l'artère. Toutes les analyses cellulaires et moléculaires suivantes ont été réalisées sur les souris Vim$^{-/-}$ vs les souris CTL.

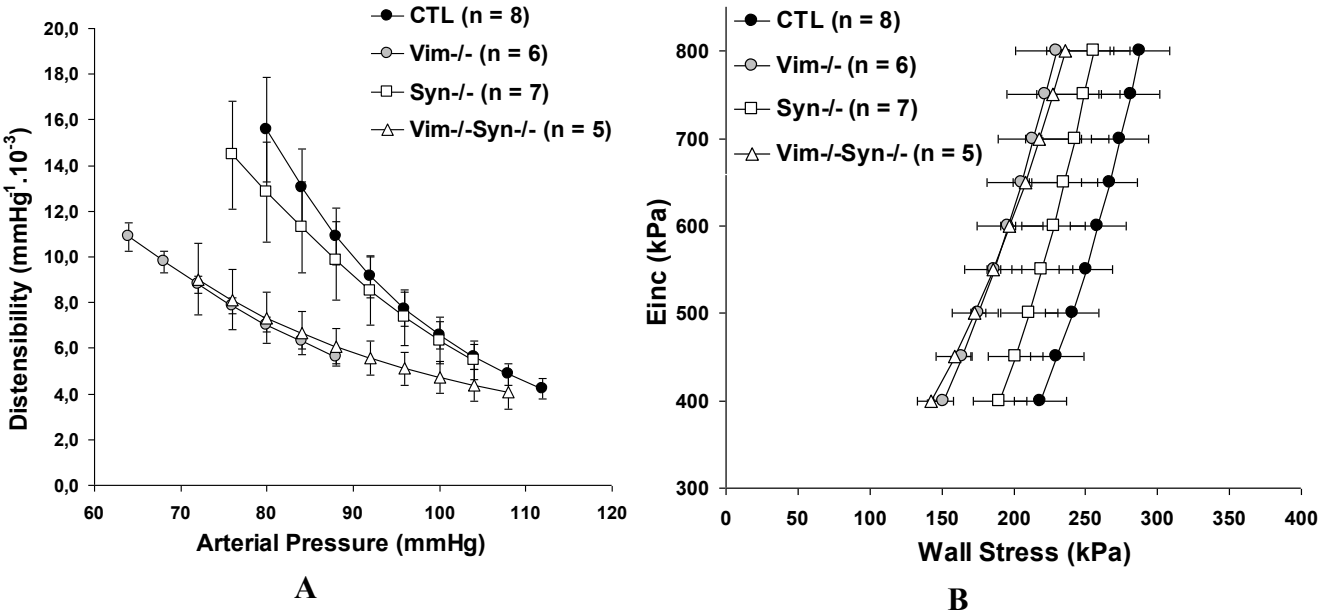



**Fig. 35. Distensibilité et module elastique (courbe Einc/WS) de l'artère carotide chez les souris CTL, Vim$^{-/-}$, Syn$^{-/-}$ et chez les doubles KO Vim$^{-/-}$Syn$^{-/-}$) :**
**A** – courbes distensibilité-pression ; **B** - courbes Einc-Wall stress. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. n = nombre d'animaux ; CTL : souris control ; Vim$^{-/-}$ : souris KO pour la vimentine ; Syn$^{-/-}$ : souris KO pour la synmémine ; Vim$^{-/-}$Syn$^{-/-}$ : souris double KO.

**Tableau 6. Parametres carotidiens mesurés chez les souris CTL, Vim$^{-/-}$, Syn$^{-/-}$ et Vim$^{-/-}$ Syn$^{-/-}$**

| | CTL | Vim$^{-/-}$ | Syn$^{-/-}$ | Vim$^{-/-}$Syn$^{-/-}$ | ANOVA |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nb de souris** | **8** | **6** | **7** | **5** | |
| **Souris conscientes** | | | | | |
| **PAS, mmHg** | 111 ± 10,5 | 91 ± 4* | 107 ± 11 | 105 ± 14 | 0,013 |
| **Souris anesthésiées** | | | | | |
| **PAS, mmHg** | 114 ± 4 | 91 ± 2* | 106 ± 5 | 109 ± 9 | 0,02 |
| **PAD, mmHg** | 80 ± 3 | 62 ± 2* | 74 ± 4 | 69 ± 4 | 0,01 |
| **PAM, mmHg** | 91 ± 3 | 72 ± 1* | 85 ± 4 | 82 ± 6 | 0,01 |
| **PP, mmHg** | 35 ± 2 | 29 ± 3 | 32 ± 3 | 40 ± 6 | 0,17 |
| **FC, bpm** | 347± 21 | 348 ± 14 | 436 ± 11 | 407 ± 16 | 0,07 |
| **Paramètres au range commun** | | | | | |
| **MDia$_{80\text{-}92}$ (µm)** | 525 ± 30 | 534 ± 20 | 519± 34 | 508 ± 42 | 0,95 |
| **MDist$_{80\text{-}92}$ ($10^{-3}$ mmHg-1)** | 12,2 ± 1,5 | 6,0 ± 0,3* | 10,6 ± 1,8 | 6,4 ± 0,9* | 0,01 |
| **MWS$_{400\text{-}800}$ (kPa)** | 256 ± 20 | 194 ± 5* | 220 ± 26 | 194 ± 22* | 0,09 |
| **Histologie de la carotide** | | | | | |
| **MCSA mm$^2$10$^{-3}$** | 25 ± 2 | 24 ± 1# | 27 ± 1 | 32 ± 1* | 0,03 |
| **Epaisseur, µm** | 21 ± 2 | 21 ± 1 | 28 ± 2* | 25 ± 3 | 0,01 |
| **Contenu en élastine, %** | 52,7 ± 1,6 | 49,3 ± 1,3 | 52,8 ± 2,5 | 48,5 ± 1,8 | 0.47 |
| **Contenu en collagène, %** | 27,2 ± 0,6 | 25,7 ± 0,9 | 27,6 ± 1,5 | 28,4 ± 1,5 | 0.23 |

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. *P<0,05 *vs* les souris CTL, # P<0,05 *vs* Vim$^{-/-}$Syn$^{-/-}$.

### III.3. Expression des composants de la membrane basale dans les souris Vim$^{-/-}$.

Aucune différence significative de la densité de collagène et d'élastine n'a été observée entre les 2 groupes de souris (Tableau 6, Figure 36 A-D).

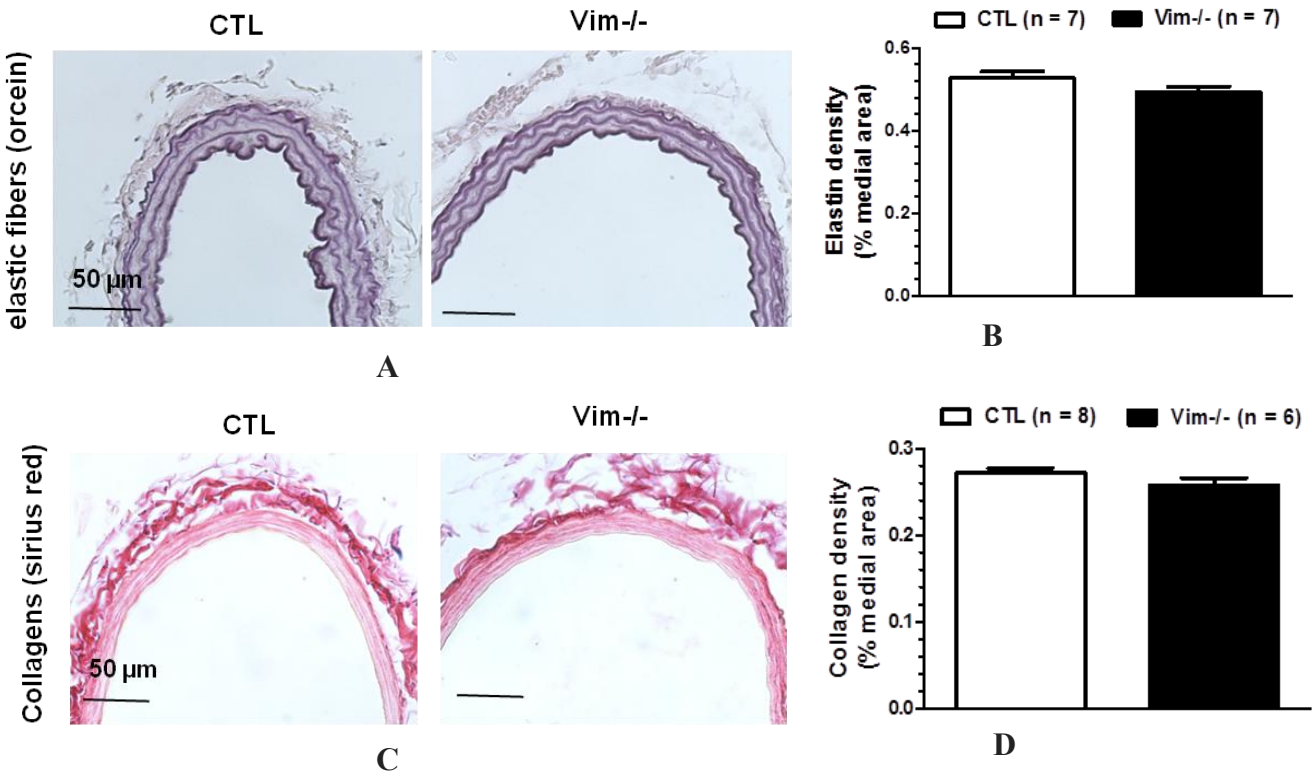
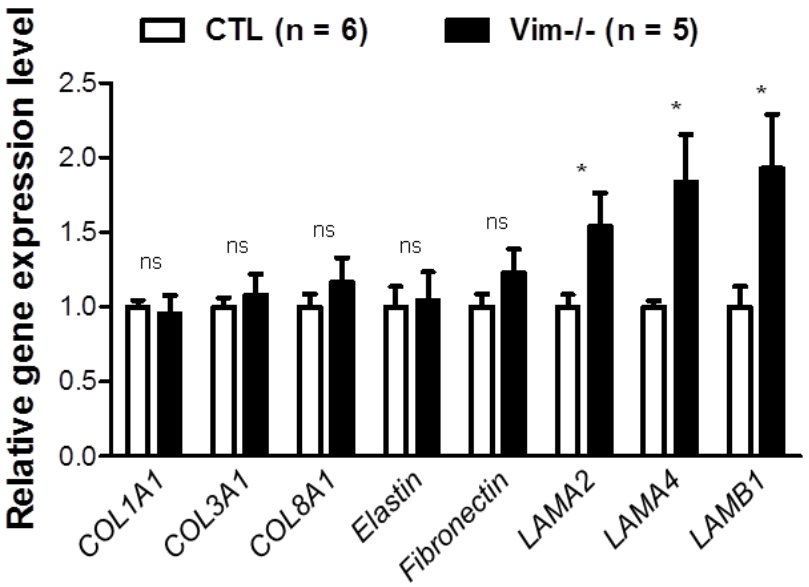
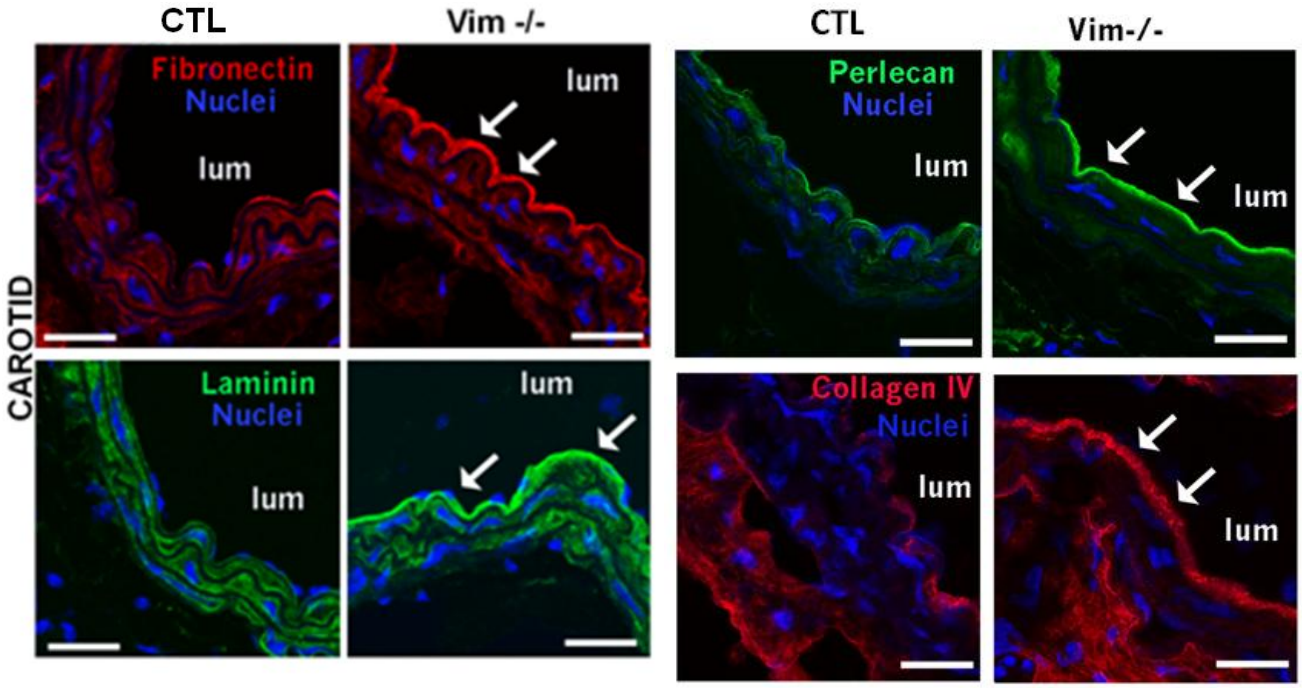



**Fig. 36. Détection du collagène totale et de l'élastine dans l'artère carotide chez les souris CTL et Vim$^{-/-}$ : A** - marquage des fibres élastiques par coloration à l'orcéine (objectif x40) ; **B** - ratio d'élastine par rapport à la surface totale de la média. **C** – marquage des fibres du collagène par coloration au Rouge Sirius (objectif x40) ; **D** – ratio du collagène par rapport à la surface totale de la média. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. CTL : souris control ; Vim-/- : souris KO pour la vimentine.

L'invalidation de la vimentine induit une augmentation de l'expression ARNm des laminines α2, α4 et β1 sans modification significative des ARNm des chaines 1A1, 3A1 et 8A1 du collagène, ainsi que de l'élastine et de la fibronectine (Figure 37A). L'analyse en Western Blot montre que la fibronectine et la laminine sont augmentées dans la carotide des souris Vim$^{-/-}$ comparées aux souris CTL (Figure 37D-E). L'immunomarquage indique que la laminine, la fibronectine, le collagène IV et le perlecan sont augmentés au niveau de la membrane basale sous-endothéliale dans la carotide des souris Vim$^{-/-}$ comparées aux souris CTL (Figure 37B-C). La VE-cadhérine qui est un marqueur spécifique de l'endothélium est augmentée dans la carotide des souris Vim$^{-/-}$ comparées aux souris CTL (Figure 37C). L'augmentation de l'expression de laminine est confirmée au niveau génique et protéique, alors que l'expression de fibronectine a été détectée seulement au niveau protéique.


CTL (n = 6)
Vim-/- (n = 5)
Relative gene expression level
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
ns
ns
ns
ns
*
*
*
COL1A1
COL3A1
COL8A1
Elastin
Fibronectin
LAMA2
LAMA4
LAMB1

A


CTL
Vim -/-
CAROTID
Fibronectin
Nuclei
lum
lum
Laminin
Nuclei
lum
lum

B


CTL
Vim-/-
Perlecan
Nuclei
lum
lum
Collagen IV
Nuclei
lum
lum
VE-cadherin
Nuclei
lum
lum

C

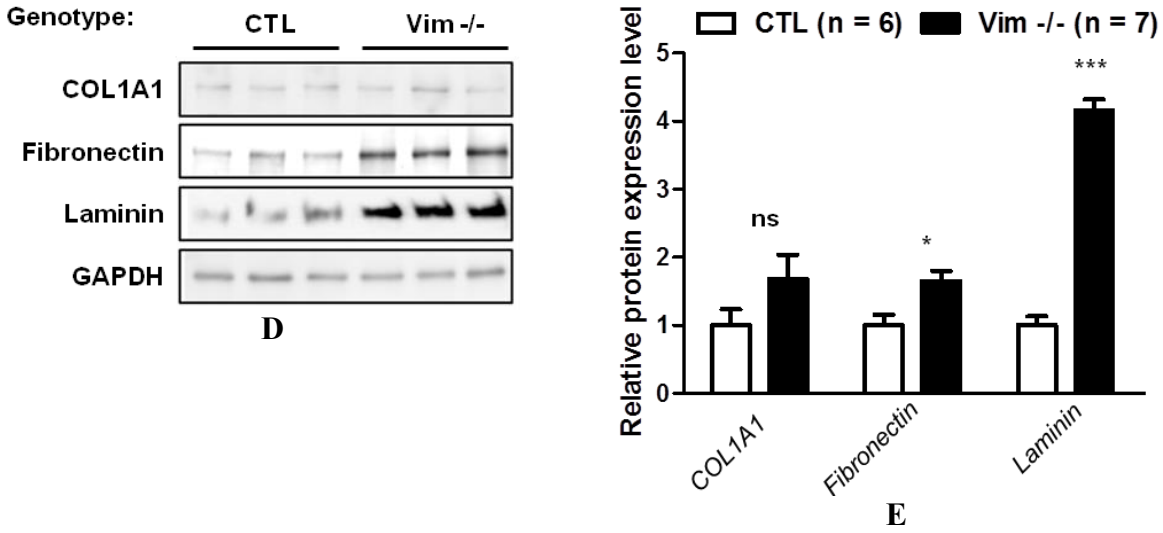



**Fig. 37. Expression des protéines de la MEC (le collagène de type 1A1, la fibronectine et la laminine) dans les aortes et les carotides chez les souris CTL et Vim$^{-/-}$ :**
**A** – Expression relative des ARNm des gènes codant pour des protéines de la MEC : les valeurs sont calculées par rapport à l'expression de la GAPDH. **B-C** – Marquage par immunofluorescence : les images ont été réalisées avec un microscope (Ziess SP5, France) (objectif x40), échelle = 25 µm ; **D** - Western Blot ; **E** – quantifications de Western Blot : l'expression relative des protein est calculé par repport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* CTL, ***P<0,001 *vs* CTL. CTL : souris control, Vim-/- : souris KO pour la vimentine ; lum = lumière vasculaire ; COL 1A1 : chaine α1 du collagène de type 1 ; COL 3A1 : chaine α1 du collagène de type 3 ; COL 8A1 : chaine α1 du collagène de type 8 ; LAMA2 : chaine α2 de la laminine ; LAMA4 : chaine α4 de la laminine ; LAMB2 : chaine β2 de la laminine.

L'analyse en microscopie électronique (Figure 38) montre l'augmentation de la densité de la membrane basale entre les CEs et la limitante élastique interne (indiqué par les flèches bleues) chez les souris Vim$^{-/-}$ par rapport aux souris CTL. Ceci pourrait correspondre à l'augmentation des composants de la membrane basale. Chez les souris CTL, les CMLVs présentent des projections « finger-like » (indiqué par les flèches blanches) ce qui permet l'ancrage aux lames élastiques (Figure 38). Chez les Vim$^{-/-}$, les CMLVs présentent moins de projections et leur membrane basale est plus lisse. Les corps denses dans les projections « finger-like » sont présents à la fois dans les souris Vim$^{-/-}$ et les souris CTL.

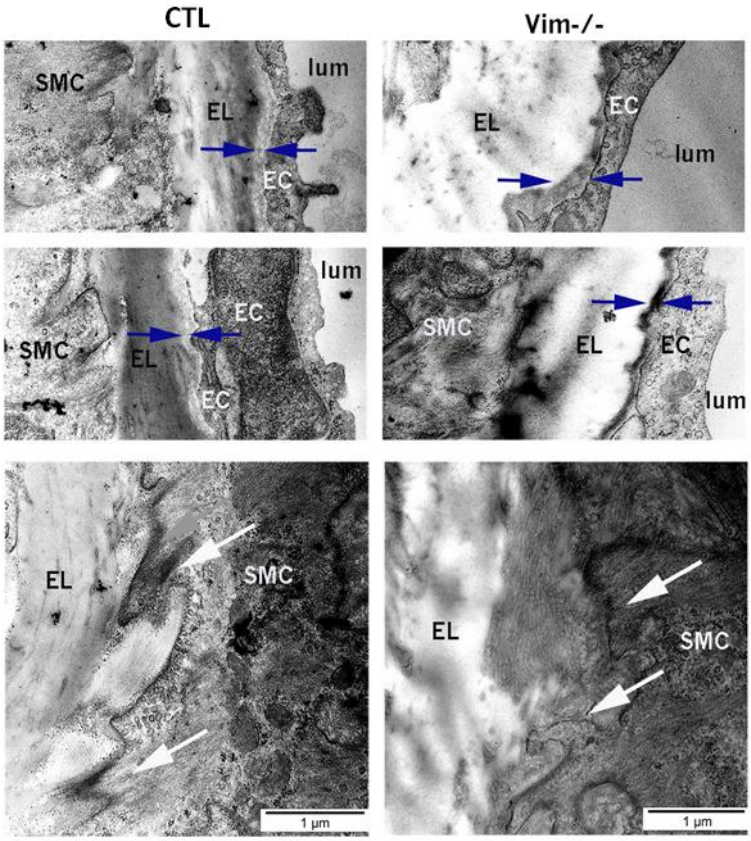



**Fig. 38. Ultrastructure des carotides chez les souris Vim$^{+/+}$ et Vim$^{-/-}$ :**
Microscopie électronique : Les coupes ultrafines ont été observées avec un microscope Zeiss oméga MET. SMC = CMLV, EL = limitante élastique, EC = cellules endothéliales, lum = lumière vasculaire. CTL : souris control, Vim-/- : souris KO pour la vimentine.

## III.4. Modification des protéines impliquées dans les adhésions focales et des récepteurs membranaires de CMLVs des souris Vim$^{-/-}$

### *III.4.1. Modification de l'expression de protéines d'adhésions focales et de protéines contractiles chez les souris Vim$^{-/-}$ dans la paroi vasculaire*

L'expression ARNm des récepteurs d'adhésions focales (EDNRB, VEGFR2, Tie2) et de récepteur de minéralocorticoïde (MR) est augmentée chez les souris Vim$^{-/-}$ par rapport aux souris CTL. L'expression des gènes spécifiques des CMLs tels que l'α-SMA, la SMMHC et la smootheline n'est pas modifiée au niveau des ARNm (Figure 39A). Le marquage immunofluorescenent n'a également pas montré la différence dans l'expression d'α-SMA entre les souris CTL et Vim$^{-/-}$ (Figure 39B). Cependant, la quantification des ces molècules en Western blot et leur analyse en immunofluorescence montrent que la SMMHC et la smootheline sont diminuées chez les souris Vim$^{-/-}$ comparées aux souris CTL (Figure 39B-D).

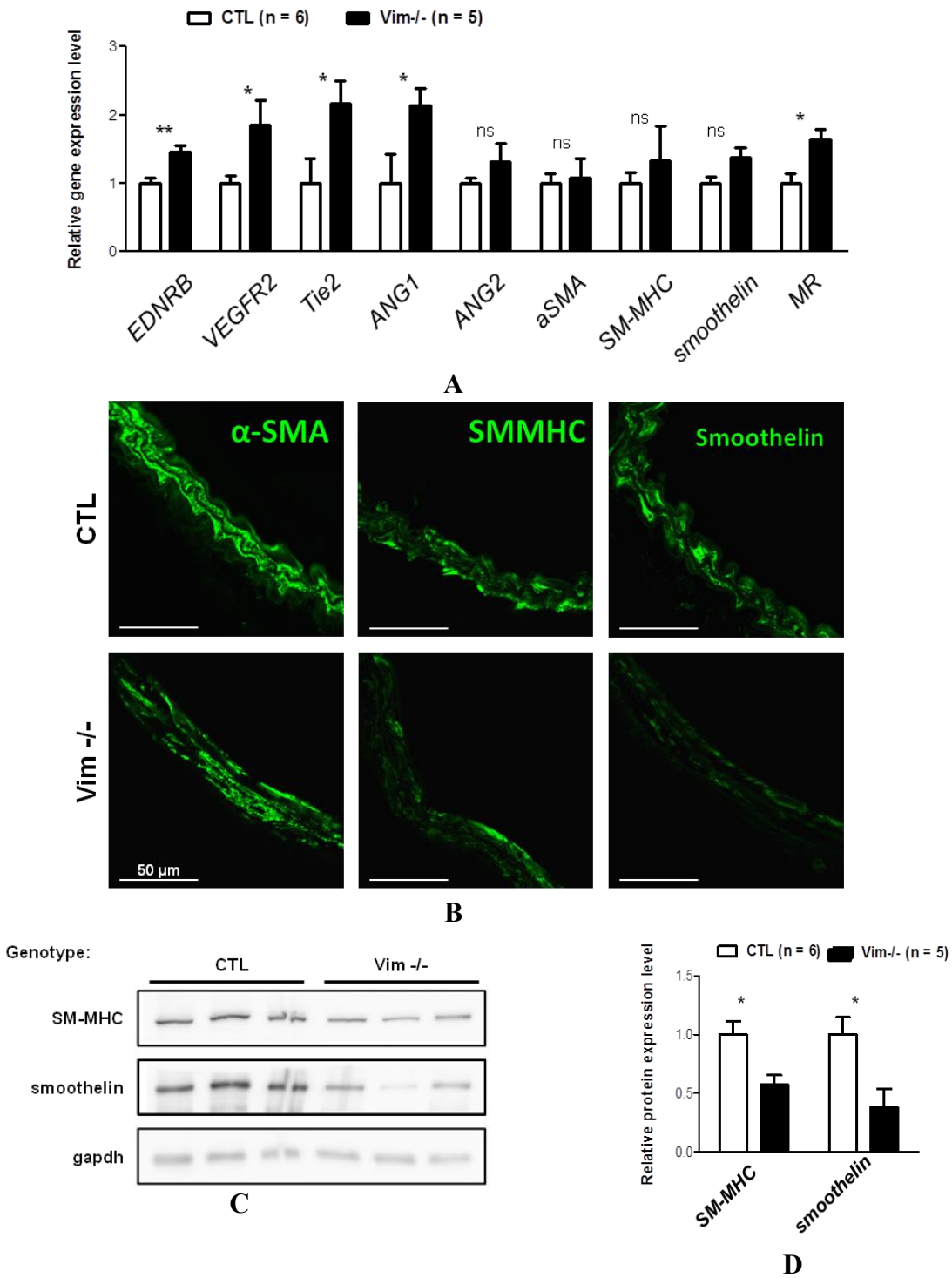



**Fig. 39. Expression des recepteurs membranaires et des protéines contractiles : dans les aortes et les carotides chez les souris Vim$^{+/+}$ et Vim$^{-/-}$ :**

**A** – Expression relative des ARNm des gènes codant pour des protéines les récepteurs membranaires et les protéines contractiles des CMLV : les valeurs sont calculées par rapport à l'expression de la GAPDH. **B** – Marquage par immunofluorescence : les images ont été réalisées avec un microscope (Zeiss SP5, France) (objectif x40) ; **C** - Western Blot ; **D** - Quantification des western blot : l'expression relative des protein est calculé par repport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* CTL.

CTL : souris control, Vim-/- : souris KO pour la vimentine ; EDNRB : endothelin receptor type B ; VEGFR2 : Vascular endothelial growth factor receptor 2 , MR : récepteur aux minéralocorticoïdes ; ITGAV : intégrine $\alpha_v$, ITGB8 : intégrine $\beta_8$. SMMHC : smooth muscle myosin heavy chain.

### *III.4.2. Augmentation de l'expression des protéines d'adhésions focales chez les souris Vim$^{-/-}$ dans la paroi vasculaire*

L'expression ARNm de sous-unités $\alpha_v$ et $\beta_8$ (ITGAV, ITGB8), est augmentée dans les vaisseaux de souris Vim$^{-/-}$ par rapport aux souris CTL (Figure 40A). L'expression des gènes des jonctions intercellulaires (ZO-1 - Zonula occludens-1 protéine, claudine, JAM1 - Junctional adhesion molecule 1, CTNNB - β-catenine, VE-cadhérine) est augmentée dans les souris Vim$^{-/-}$. L'expression de gènes de Cx37, de taline et vinculine est identique chez les deux génotypes. En revanche la E-cadhérine (ECADH) est diminuée dans les souris Vim$^{-/-}$ (Figure 40A-D) comparée aux souris CTL. La diminution de la E-cadhérine et l'augmentation de l'intégrine $\alpha_v$ ont été confirmées au niveau protéique par Western blot et analyse par immunomarquage (Figure 40B-D).

Afin d'analyser si l'invalidation de la vimentine modifie également les protéines du cytosquelette impliquées dans la liaison des intégrines au cytosquelette d'actine, nous avons quantifié la FAK (Figure 40A et 41A-B) et la taline en ARNm et en protéines (Figure 41A, 41C-D). L'expression protéique de FAK n'est modifiée dans les souris Vim$^{-/-}$ bien que l'expression ARNm FAK soit augmentée. Nous avons mesuré une augmentation protéique de la taline dans les souris Vim$^{-/-}$ *vs* CTL (Figure 40C-D).

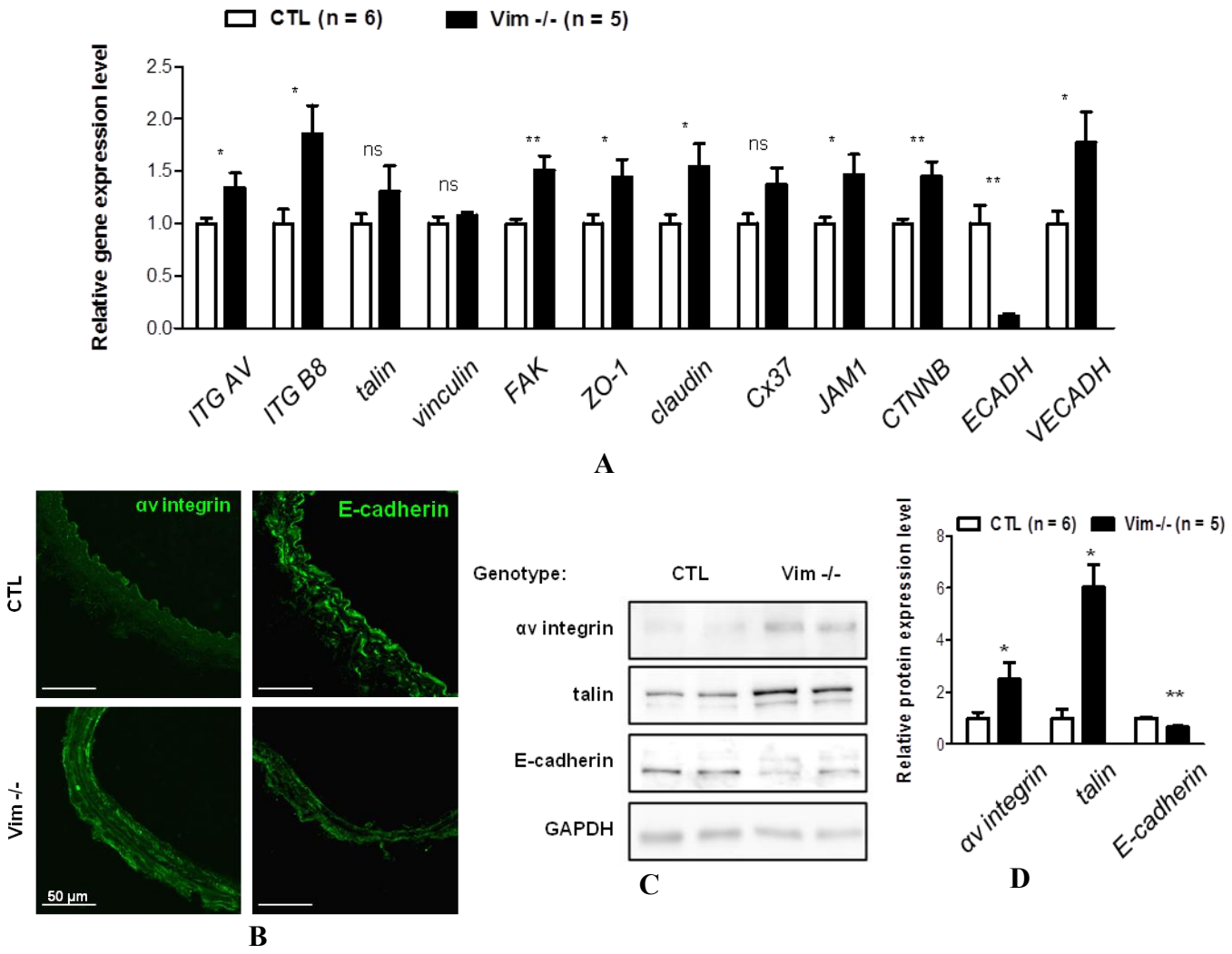



**Fig. 40. Expression des gènes et des protéines de contacts focaux, des protéines de jonctions intercellulaires et du cytosquelette dans les aortes et les carotides chez les souris CTL et Vim$^{-/-}$ :**

**A** – Expression relative par RT-qPCR des ARNm : les valeurs sont calculées par rapport à l'expression de la GAPDH; **B** – Marquage par immunofluorescence : les images ont été réalisées avec un microscope (Zeiss SP5, France) (objectif x40) ; **C** - Western Blot ; **D** - Quantification de Western Blot : l'expression relative des protein est calculé par repport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* CTL ; **P<0,01 *vs* CTL.

CTL : souris control, Vim$^{-/-}$ : souris KO pour la vimentine ; ITGAV : intégrine $\alpha_v$, ITGB8 : intégrine $\beta_8$, FAK : focal adhesion kinase ; ZO-1 - Zonula occludens-1 prtoéine ; Cx37 – connexine 37 ; JAM1 : Junctional adhesion molecule 1 ; CTNNB : β-catenine.

### *III.4.3. Altération de la signalisation cellulaire chez les souris Vim$^{-/-}$ dans la paroi vasculaire*

Afin d'analyser si les changements dans les protéines d'adhésions focales altère la signalisation cellulaire, nous avons étudié la phosphorylation de FAK, Src, et ERK1/2. Nous avons mesuré une augmentation de la phosphorylation de FAK, Src et ERK1/2 chez les souris Vim$^{-/-}$ par rapport aux souris CTL (Figure 41A-B).

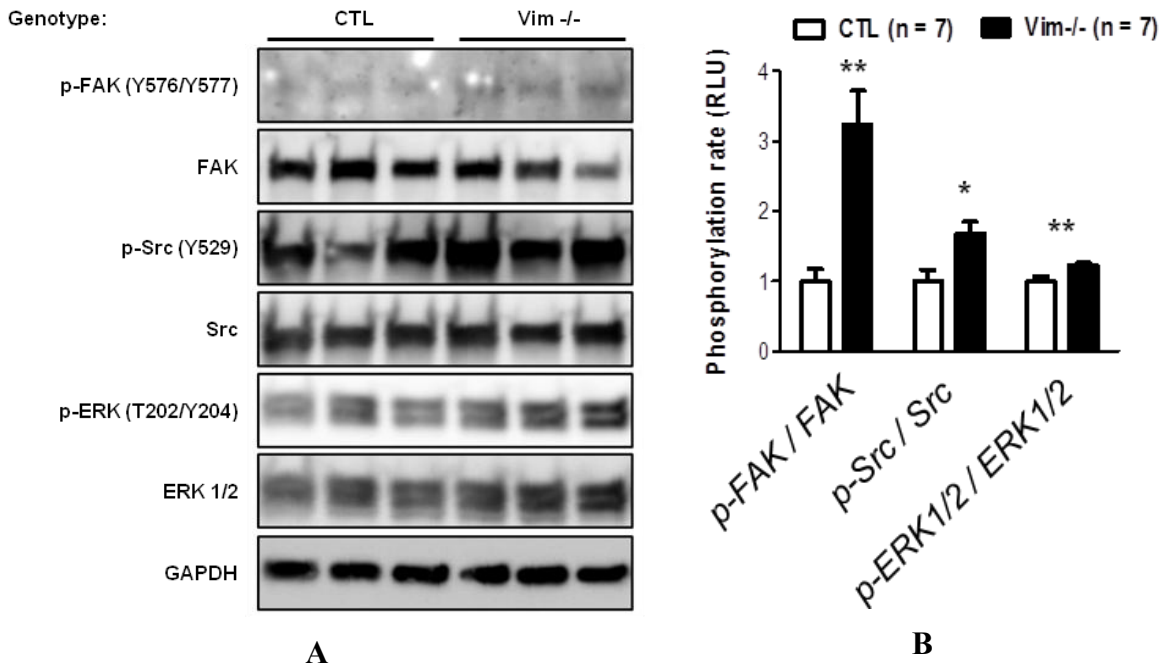



**Fig. 41. Expression de protéines de la signalisation intracellulaire FAK, Src et ERK1/2 dans les aortes chez les souris CTL et Vim$^{-/-}$ : A** – Western Blot ; **B** - Quantification des western blot : rapport protéines phosphorylées/protéines totales. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM ; *P<0,05 *vs* CTL, **P<0,01 *vs* CTL. FAK - focal ahesion kinase ; ERK1/2 - Extracellular signal-regulated kinase, early response kinase ½; Src - Proto-oncogene tyrosine-protein kinase.

## Conclusion

Ces résultats montrent l'importance de la vimentine dans l'augmentation de la rigidité artérielle : l'invalidation de cette protéine induit une diminution de la distensibilité et une augmentation de Einc chez les souris Vim$^{-/-}$ par rapport à leurs contrôles. Ces changements sont accompagnés d'une PA diminuée chez les souris Vim$^{-/-}$. Cela nous permet de conclure que la PA n'est pas le facteur principal determinant l'augmentation de la rigidité artérielle chez les souris Vim$^{-/-}$. L'absence de différence d'épaisseur vasculaire, de MCSA, ainsi que le contenu en élastine et collagène dans la média carotidienne identique entre les souris Vim$^{-/-}$ et CTL montre que la rigidité acccrue n'est pas liée à l'hypertrophie ou au processus fibrosant.

L'invalidation de la vimentine induit une augmentation de l'expression des protéines adhésives de la MEC (fibronectine, laminine), du cytosquelette (taline) et de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines qui participe à la formation d'adhésions focales. Ceci pourrait être le mécanisme compensatoire pour maintenir le tonus et l'intégrité vasculaire malgré la perturbation de la formation des filaments inttermediaires cytosquelettiques liée à l'absence de la vimentine. Nous avons également mis en évidence une altération de la signalisation cellulaire liée à une augmentation de la phospohorylation des protéines FAK, Src et ERK1/2

chez les souris $Vim^{-/-}$, protéines qui participent à la signalisation induisant la formation des adhésions focales.

La diminution de l'expression des protéines de l'appareil contractile des CMLV (la SMMHC et la smootheline) induite par l'invalidation de la vimentine pourrait être liée à la diminution de la pression artérielle chez les souris $Vim^{-/-}$. Cela nous montre l'importance de la vimentine pour l'intégrité de la paroi vasculaire et les interactions des CMLVs avec la MEC.

En conclusion, l'invalidation de la vimentine entraine un remodelage de la paroi artérielle en affectant le phénotype des CMLVs, les interactions cellules-matrice et les voies de signalisation des intégrines. La résultante de ce rémodelage vasculaire est une augmentation de la rigidité arterielle.

# DISCUSSION

Notre étude a porté sur les conséquences *in vivo* des modifications phénotypiques vasculaires et le développement de la rigidité artérielle induite par l'inactivation des gènes MR, de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines ou de la vimentine chez la souris. Nous avons montré que la rigidité artérielle a une dépendance multifactorielle. Elle est hautement dépendante de l'organisation du cytosquelette des CMLV et de leurs interactions avec la MEC. Le développement de la rigidité artérielle est souvent associé avec l'hypertension et la fibrose vasculaire qui dépendent également des intégrines membranaires des CMLV tels que l'intégrine $\alpha_v$ (Belmadani *et al*., 2008) et des interactions entre le MR et son ligand l'aldostérone (Barrett *et al*., 2013 ; Brown, 2013).

Dans la première partie de ce travail nous avons analysé le rôle MR des CMLV dans la réactivité vasculaire. Chez des souris adultes, McCurley *et al*. (McCurley *et al*. 2012) ont utilisé un modèle d'inactivation conditionnelle du MR dans les CML induit par injections de tamoxifène : les souris ont été invalidées pour le MR pendant une durée de 2 mois avant d'être mise en mort. Dans ce modèle, il a été montré que la contraction à la Phe était identique chez les souris $MR^{SMKO}$ adultes (âge 3-4 mois) comparées aux souris contrôles de même âge. Parallèlement ils ont montré une augmentation de la vasodilatation endothélium-dépendante chez les souris $MR^{SMKO}$ adultes. En utilisant notre modèle d'inactivation constitutive du MR dans les CMLV dès la naissance, nous ne confirmons pas les résultats sur la relaxation. Nos données montrent que l'invalidation constitutive du MR dans des CMLV affecte à la fois les voies endothéliale en réponse à l'Ach et non-endothéliale en réponse au SNP. La relaxation endothélium-dépendante à l'Ach implique le NO ou sa combinaison avec la voie des prostanoïdes endogènes. Nous n'avons pas remarqué de différences de relaxation concernant la voie des prostanoïdes entre les souris CTL et $MR^{SMKO}$. Nous avons trouvé que l'activité eNOS est augmentée chez les souris $MR^{SMKO}$, suggérant un mécanisme compensatoire possible pour contrecarrer l'insensibilité relative des CMLV au NO. De plus, la relaxation induite par un analogue de cGMP (8-Br-GMPc) est similaire dans les deux groupes de souris $MR^{SMKO}$ et CTL. La diminution de l'activité de la guanylate cyclase peut expliquer la diminution de la réponse au SNP.

Concernant la contraction, la réponse à la Phe a été independant d'endothélium et similaire dans les deux études (sans différence entre les souris CTL et $MR^{SMKO}$). Les réponses au KCl et $Ca^{2+}$ dans notre modèle ont été clairement diminuées chez les souris $MR^{SMKO}$, alors que McCruley *et al*. n'ont pas montré la différence en réponse au KCl chez les souris adultes. Dans le modèle inductible utilisé dans le travail de McCruley *et al*, les différences de

réactivité sur la relaxation et contraction au KCl par rapport à notre modèle pourraient être la conséquence d'un temps d'inactivation trop court car survenant à l'âge adulte.

L'activation des canaux calciques voltage - dépendant contribue au tonus myogénique tandis que les canaux potassiques activés par le $Ca^{2+}$ (BKCa) contre-régulent la constriction myogénique. Dans nos études, comme dans les travaux de McCurley *et al*., il existe une diminution importante de la contraction des CMLV en réponse au $Ca^{2+}$ extracellulaire chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris CTL. Nous avons montré que la libération du $Ca^{2+}$ sarcoplasmique n'a pas été modifiée. Cela nous a permis de postuler que le stockage du $Ca^{2+}$ intracellulaire n'était pas impliqué dans la réponse altérée au $Ca^{2+}$ extracellulaire chez les souris mutantes. L'ensemble de ces résultats confirment une altération du couplage relaxation-contraction dans ce modèle d'inactivation du MR.

Nous avons ensuite montré une diminution de la phosphorylation des protéines intervenant dans la contraction (MLCK, MLC2 et MYPT1) chez les souris $MR^{SMKO}$ par rapport aux souris CTL. Cela nous a permis de conclure que la présence du MR est indispensable pour maintenir une activation tonique de l'appareil contractile dans les CMLV. L'activation de la MLCK et la phosphorylation de la MLC sont considérées comme des événements clés dans l'initiation de la contraction des CML (Watanabe *et al*. 2001). Les inhibiteurs de MLCK empêchent la phosphorylation de MLC et bloquent la contraction des CML. L'inhibition de MLCK dans les CE diminue la relaxation endothélium-dépendante en empêchant l'augmentation du $Ca^{2+}$ intracellulaire qui à son tour active la eNOS et la production du NO (Watanabe *et al*. 2001). Nos résultats sont en accord avec ces données concernant la diminution de la contraction induite par le $Ca^{2+}$ chez les souris $MR^{SMKO}$ possiblement à cause de la diminution de la sensibilité des CMLV au $Ca^{2+}$ et de la phosphorylation de MLCK $Ca^{2+}$-dépendante.

Selon des travaux précédents MYPT1 joue un rôle important dans la vasodilatation induite par les agents cGMP-sensibles tels que NO. La réduction de MYPT1 pourrait expliquer la diminution de la relaxation NO-dépendante (Ma *et al*. 2010) observé dans notre modèle de souris $MR^{SMKO}$.

En utilisant le même modèle de souris $MR^{SMKO}$, recevant un traitement chronique par l'aldostérone et sel, Galmiche *et al*. (2014) ont montré une diminution de la rigidité artérielle indiquant que c'est bien le MR présent au niveau des CMLV qui contrôle l'élasticité de la paroi des artères. Nous avions noté une moindre augmentation de l'expression des intégrines (en particulière de la sous-unité $\alpha_5$) au niveau des CMLVce qui renforçait l'idée d'une implication forte de ces récepteurs dans la rigidité artérielle via la formation des attachements

cellules-matrice. Cette observation avec d'autres données du laboratoire nous ont conduit logiquement à poursuivre notre travail sur les intégrines des CMLV et fonction artérielle.

Dans la deuxième partie nous avons étudié le rôle de la sous-unité $\alpha_v$ des intégrines du muscle lisse vasculaire dans le développement de la rigidité et de la fibrose artérielle. Nous avons utilisé un modèle de souris invalidée de façon conditionnelle à l'âge adulte pour cette intégrine dans les CMLV. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est associée à l'angiogenèse, l'inflammation, la perméabilité capillaire et la migration des CMLV ce qui représente une cible moléculaire prometteuse pour le traitement de la fibrose et de la re-sténose après une angioplastie (Kappert *et al*. 2001 ; Zhou *et al*. 2006 ; Li *et al*. 2009 ; Bunni *et al*. 2010).

Dans ce modèle, nous avons démontré une diminution de la fibrose en réponse à l'administration chronique d'Ang II et ce de façon indépendante à l'augmentation de pression arétrielle. La sous-unité $\alpha_v$ peut avoir plusieurs partenaires au niveau des CMLV : $\beta_1$, $\beta_3$, $\beta_5$, $\beta_6$ et $\beta_8$. Nous sommes été interessé en particulier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ car elle est la plus présente sur les CMLV et joue un rôle important dans la formation des adhésions focales des CMLV à la MEC.

Différentes études ont montré que l'augmentation de la PA chez les rats SHR est accompagnée de la surexpression des intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ (Bézie *et al*. 1998 ; Intengan *et al*., 1999). D'autres études ont montré que l'invalidation d'intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_v$ (en particuliere $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$) ne modifie pas la PA chez les rongeurs (Louis *et al*. 2007 ; Heerkens *et al*. 2006 ). Dans nos études nous n'avons également pas trouvé de différence de la PAS à l'état vigile chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ comparées aux souris WT.

Qiu *et al*. (2010) en utilisant des cultures de CMLV de singes (*Macaca fascicularis*) ont rapporté que l'augmentation de la rigidité des CMLV aortiques *in vitro* au cours du vieillissement est attribuable non seulement à des changements de la MEC mais également à l'augmentation de la rigidité intrinsèque des CMLV. L'inactivation spécifique de la sous-unité $\alpha_v$ dans les CMLV permet d'étudier le rôle de la voie $\alpha_v\beta_3$ sur la différenciation cellulaire et la rigidité artérielle *in vivo*. A l'état basal, nous avons constaté une augmentation de la distensibilité artérielle (mesurée au niveau de la PAM) chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ par rapport aux souris WT sans modifications des contenus en élastine et collagène. Les courbes module élastique/contrainte circonférentielle sont identiques dans les 2 groupes.

Nous avons également étudié l'influence de la sous-unité $\alpha_v$ sur la rigidité artérielle et la fibrose dans un modèle d'hypertension artérielle en réponse à l'Ang II. La fibrose étant définie comme une accumulation du collagène dans la paroi artérielle notamment dans la média. La fibrose vasculaire a été étudiée en réponse à deux doses d'Ang II : 0,3 mg/kg/jour

(dose faible) et 1,5 mg/kg/jour (dose forte). Ces doses ont été choisiés selon les données bibliographiques (Louis *et al*. 2007 ; Jacobi *et al*. 2008 ; Stawski *et al*. 2014) pour étudier l'effet dose-dépendant d'Ang II sur les paramètres prinicpaux de la rigidité (la distensibilité et le module élastique) et l'implication de la sous-unité $\alpha_v$ dans le développement de la rigidité artérielle. L'Ang II a entrainé une augmentation dose-dépendante du contenu en collagène de la média carotidienne dans le groupe WT qui n'est pas observée dans le groupe $\alpha_v^{SMKO}$

Après traitement à l'Ang II à 0,3 mg/kg/jour nous avons constaté une augmentation de la distensibilité chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ sans modification du module élastique par rapport aux souris WT. Ceci montre une moindre rigidité artérielle des souris $\alpha_v^{SMKO}$. Après traitement à 1,5 mg/kg/jour d'Ang II nous avons mis en évidence une diminution de distensibilité et une augmentation du module élastique identiques chez les deux génotypes. Cela pourrait être expliqué par la non-intervention de la sous-unité $\alpha_v$ dans le développement de la rigidité artérielle à cette dose d'Ang II.

Au plan mécanistique, le développement de la fibrose vasculaire dépend de la voie Smad/TGF-β1 : nous avons constaté une moindre expression du TGF-β1 et des chaines 1A1 et 1A2 du collagène de type I et de la chaine 3A1 du collagène de type III chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$. Cette diminution de la quantité en collagène ne s'est pas traduite en termes d'élasticité puisqu'en présence de la forte dose d'Ang II, les changements de distensibilité et de module élastique sont comparables dans les 2 génotypes.

Nos résultats sont en accord avec l'étude de Belmadani *et al*. (2008) qui ont rapporté une augmentation du dépôt du collagène de type I dans les artères mésentériques chez les souris hypertendues diabétiques, *via* l'activation de la voie Smad2. Cette activation est dépendante de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ : en effet un antagoniste spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (SB-223245) diminue la phosphorylation de Smad2 et l'expression du TGF-β1 (Belmadani *et al*., 2008). Coleman *et al*. (1999) ont également montré que l'invalidation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ réduit l'expression de TGF-β1 au sein de la paroi vasculaire chez les lapins avec hypercholestérolémie. D'autres études ont montré que l'invalidation de l'intégrine $\alpha_v$ ($\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_v\beta_8$) dans des fibroblastes et des myofibroblastes diminue l'activation du TGF-β1, inhibe l'expression de gènes profibrotiques (les gènes du Col1A1, Col3A1 et du TGF-β1) et permet ainsi de protéger certains tissus (foie, poumons, reins) du développement de la fibrose (Munger *et al*., 1999 ; Hahm *et al*., 2007 ; Henderson *et al*., 2013 ; Madala *et al*., 2013).

Il a été montré que la stimulation à l'Ang II et/ou au TGF-β1 augmente l'expression de la sous-unité $\alpha_v$ sur les CMLV (Byzova *et al*. 1998 ) et sur les fibroblastes cardiaques (Kawano *et al*. 2000). Chez nos souris $\alpha_v^{SMKO}$ après l'invalidation conditionnelle il y a une

expression residuelle de la sous-unité $\alpha_v$ dans les CMLV. Après 1,5 mg/kg/jour d'Ang II nous avons également montré une augmentation de l'expression d'intégrine $\alpha_v$ dans la carotide chez les deux génotypes, mais le taux d'expression a été moindre chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$. Cette moindre expression de la sous-unité $\alpha_v$ chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ peut donc expliquer moins de fibrose par rapport aux souris WT en réponse à l'Ang II.

La voie TGF-β1 contrôle le phénotype contractile des CMLVs *via* les voies Smad3 et p38/MAPK. Ceci se traduit par une augmentation des marqueurs spécifiques du muscle lisse, tels que l'α-SMA, la SMMHC et la SM-calponine (Rensen *et al*. 2007 ; Pardali *et al*. 2010). A l'état de base comme en réponse à l'Ang II, l'expression de la SMMHC est plus faible chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$ par rapport aux animaux contrôles. Ces changements phénotypiques des CMLVs *via* la diminution de l'activation de la voie TGFβ1 pourrait être une explication à la diminution de la fibrose vasculaire chez la souris $\alpha_v^{SMKO}$.

Les études de réactivité vasculaire montrent que les intégrines jouent un rôle important dans le maintien du tonus myogénique et de la vasoréactivité : l'activation des intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$ induit le renforcement de l'influx de $Ca^{2+}$ *via* les canaux calciques de type L et une augmentation de la vasoconstriction dans des artérioles crémasteres chez les rats (Davis *et al*. 2001 ; Wu *et al*. 2001 ; Waitkus-Edwards *et al*. 2002, Martinez-Lemus *et al*. 2005). En revanche, la stimulation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ entraîne une inhibition significative des flux calciques dans les CMLV des artérioles, ce que suggère un lien avec des voies de signalisation $Ca^{2+}$-dépendantes (Wu *et al*. 1998 ; Davis *et al*. 2001). L'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ pourrait dans ces conditions induire une vasoconstriction plus forte. Selon nos résultats, l'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ induit une augmentation de la contraction à la Phe dans la carotide et une tendanse d'augmentation dans l'aorte chez les souris $\alpha_v^{SMKO}$. Ce résultat est en accord avec ces données bibliographiques. Le même niveau de rigidité artérielle en réponse à l'Ang II chez la souris $\alpha_v^{SMKO}$ malgré des contenus plus faibles en collagène (Col1A1, Col1A2 et Col3A1) pourrait être en rapport avec une augmentation du tonus vasculaire à l'état basal. La diminution des voies de la relaxation *via* la dysfonction endothéliale pourrait également y contribuer.

Dans la troisième partie de ma thèse, nous avons montré l'importance de la vimentine et de la synemine dans l'organisation intracellulaire des CMLVs et des CEs et donc dans la rigidité artérielle. Les protéines des filaments intermédiaires (IF) appartiennent à l'une des trois familles principales du cytosquelette des cellules eucaryotes avec les microtubules et microfilaments (Janmey *et al*. 1991 ; Wang *et al*. 2000). La vimentine est une protéine

principale des IF de type III, la synémine est une protéine des IF de type IV. La synemine nécessite des partenaires de co-polymérisation appropriées telles que la desmine, la vimentine ou la kératine en fonction du type de cellule pour former des structures filamenteuses (Khanamiryan *et al*. 2008 ; Xue *et al*. 2004). Des travaux précédents ont démontré que l'expression et la localisation des filaments de synémine sont dépendantes de la présence de vimentine dans les vaisseaux sanguins (Xue *et al*. 2004). Chez des souris invalidées pour la desmine ou la vimentine dans les CMLVs, les filaments de synémine sont instables et délocalisés (Izmiryan *et al*. 2009 ; Xue *et al*. 2004). Chez les souris $Vim^{-/-}$, la synémine, en raison de ce défaut de polymérisation, n'est plus en mesure de former un cytosquelette complet et fonctionnel. Cela peut expliquer des propriétés mécaniques identiques entre les souris $Vim^{-/-}Syn^{+/+}$ et $Vim^{-/-}Syn^{-/-}$ mesurées par échotracking de l'artére carotide. A l'inverse, il a été montré que la synemine peut fonctionner comme une protéine d'ancrage pour la protéine kinase A (PKA) et contrôler ses voies de signalisation (Russell *et al*. 2006 ; Li *et al*. 2014) Les souris $Syn^{-/-}$ développent une hypertrophie du muscle squelettique (Li *et al*. 2014). Nos résultats sont en accord avec ces données bibliographiques car nous avons constaté une augmentation de la surface de la média chez les souris $Vim^{-/-}Syn^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles $Vim^{+/+}Syn^{+/+}$.

Nos résultats montrent que l'inactivation de la vimentine seule est suffisante pour augmenter la rigidité vasculaire *in vivo*. Ce résultat semble en désaccord avec les expériences *in vitro* (fibroblastes, T-lymphocytes, cellules gliales de la rétine) où les filaments de vimentine induisent une plus grande rigidité cellulaire. Les cellules invalidées pour la vimentine ou présentant une perturbation des filaments de vimentine (colchicine, nocodazole) ont une rigidité plus faible comparé aux cellules contrôles (Eckes *et al*. 1998 ; Wang et Stamenovic 2000 ; Brown *et al*. 2001 ; Lu *et al*. 2011). Son rôle est en fait complexe à analyser, car Mendez *et al*. en utilisant la microscopie à force atomique ont montré que la vimentine protège la cellules des contraintes mécaniques et préserve en fait l'intégrité mécanique des fibroblastes embryonnaires de souris (Mendez *et al*. 2014). Ce système de protection assurée par la vimentine dépend aussi du substrat utilisé pour cultiver les cellules. Ces résultats suggèrent l'implication des complexes d'adhésion focale liant les cellules à leur membrane basale (Ofek *et al*. 2009). Les CE, les CMLV et les fibroblastes dans la paroi des vaisseaux sont constamment exposés aux contraintes mécaniques pulsatiles liées au flux ou à la pression sanguine. Nous avons formulé l'hypothèse que des changements structuraux des membranes basales ou des adhésions focales des CE et des CMLVs pourraient contribuer à l'augmentation de la rigidité artérielle.

Chez les souris invalidées pour la vimentine, les quantités de collagène et d'élastine sont identiques à celle des souris $Vim^{+/+}$. Néanmoins les quantités de fibronectine et de laminine sont augmentés dans les carotides et les aortes de souris $Vim^{-/-}$. L'expression accrue de ces protéines peut suggérer un remodelage des membranes basales des cellules vasculaires et de leurs attachements avec la matrice extracellulaire. L'expression de l'intégrine $\alpha_v$, partie prenante des adhésions focales, est aussi augmentée chez les souris $Vim^{-/-}$ et pourrait participer à l'augmentation de la rigidité artérielle.

Dans les CEs, la vimentine interagit au niveau des adhésions focales (FAs) (Tsuruta et Jones 2003 ; Kreis *et al*. 2005 ; Bhattacharya *et al*. 2009 ; Esue *et al*. 2006) avec des structures appelées VAMS « vimentin associated matrix adhesions ». Les VAMS sont des sites où la vimentine et l'actine sont liées aux intégrines et qui recrutent des protéines telles que la vinculine et la plectine (Gonzales *et al*. 2001 ; Ivaska *et al*. 2007 ; Osmanagic-Myers *et al*. 2015). La vimentine est un déterminant majeur de la fonctionnalité des complexes VAMS. Il est connu que les CE invalidées pour la vimentine par des siRNAs perdent une grande partie de leurs capacités d'adhésion. (Tsuruta et Jones 2003).

L'augmentation de la phosphorylation des protéines FAK, Src et ERK1/2 ainsi que la diminution du marqueur endothélial E-cadherine chez les souris $Vim^{-/-}$ pourrait expliquer l'augmentation des composants de la membrane basale conduisant à un niveau de rigidité plus élevé du l'espace sous-endothélial. En retour, ces modifications entretiendraient une activation endothéliale permanente et délétère.

D'autres facteurs pourraient intervenir sur la rigidité des souris $Vim^{-/-}$, notamment les changements des interactions CMLV-matrice extracellulaire. Nous avions démontré chez la souris invalidée pour la desmine (Lacolley *et al*. 2001), des altérations très marquées de la structure des CMLVs en particulier la disparition des prolongements membranaires en direction de la matrice extracellulaire aux niveaux des FAs. Il est important ici de noter que la desmine n'est pas modifiée chez la souris $Vim^{-/-}$ mais que des modifications identiques de la membrane des CMLVs sont observées. Nous pouvons retenir l'hypothèse que la rigidité excessive des souris $Vim^{-/-}$ est due à la fois à des altérations importantes des CEs dans leur environnement ou la vimentine est très exprimée mais également à celles des CMLVs en interactions avec les protéines matricielles et mettant en jeu les intégrines.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La rigidité artérielle a une dépendance multi - factorielle : changements dans la MEC, interactions cellules-matrice, caractéristiques intrinsèques des CMLV et des CEs au niveau du cytosquelette et des FAs (Sehgel *et al*. 2015).

Nous avons montré que le MR des CMLV a une influence directe sur la fonction artérielle étant impliqué dans les processus de contraction, de relaxation et de rigidification de la paroi. Il est possible d'émettre l'hypothèse que ces mêmes processus interviennent au niveau de la macro-, et microcirculation bien qu'il soit plus difficile au niveau des artères musculaires de mesurer la rigidité artérielle. Les effets bénéfiques des antagonistes du MR dans l'hypertension artérielle ou l'insuffisance cardiaque peuvent ainsi être réinterprétés par le biais de leurs effets positifs au niveau périphérique artériel. Les effets profibrosants de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dont la signalisation partage des voies communes avec le récepteur MR ouvrent également des perspectives intéressantes dans ce sens. Une stratégie propre anti-intégrine n'est pas encore développée dans les maladies artérielles en dehors de l'angiogenèse et des phénomènes d'agrégation plaquettaire. L'inhibition conjointe des voies d'$\alpha_v\beta_3$ et/ou de TGF-β dans la fibrose pourrait aussi avoir des effets délétères en particulier sur le développement ou l'aggravation des anévrysmes de l'aorte abdominale (Ait-Oufella *et al*. 2010). L'action des nouveaux anti-coagulants anti-thrombine ou anti-facteur X ne sont pas connus au niveau de la paroi artérielle surtout en présence d'une dysfonction endothéliale. Enfin le réseau des filaments intermédiaires des CMLVs et des CEs semble exercer un rôle important dans la rigidité cellulaire bien qu'il soit encore trop tôt pour faire le lien précis entre rigidité cellulaire et rigidité tissulaire. En ce sens des recherches menées sur des CMLV de patients ou générées à partir de cellules humaines iPS seraient intéressantes pour approfondir nos connaissances sur ces molécules. Il serait également utile d'examiner si certaines formes cliniques de rigidité artérielle observées au cours du diabète, du vieillissement ou de maladies vasculaires rares sont associées à des mutations de ces molécules.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ait-Oufella H., Wang Y., Herbin O., Tedgui A., Mallat Z. Role of TGF-ß in a model of abdominal aortic aneurysm in mice. Med Sci (Paris);26(10):795-797 (2010).

Akopova O., Kotsiuruba A., Korkach Y., Kolchinskaya L., Nosar V., Gavenauskas B., Serebrovska Z., Mankovska I., Sagach V. The Effect Of NO Donor on Calcium Uptake and Reactive Nitrogen Species Production in Mitochondria. Cell Physiol Biochem.39(1):193-204 (2016).

Albinsson S., Hellstrand P. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol.293(2):C772-782 (2007).

Alexander M.R., Owens G.K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. Annu Rev Physiol.74:1–28 (2012).

Annes J.P., Rifkin D.B., Munger J.S. The integrin alphaVbeta6 binds and activates latent TGFbeta3. FEBS Lett.30;511(1-3):65-68 (2002).

Atkins K.B., Seki Y., Saha J., Eichinger F., Charron M.J., Brosius F.C. Maintenance of GLUT4 expression in smooth muscle prevents hypertension-induced changes in vascular reactivity. Physiol Rep.12;3(2):1-12 (2015).

Avolio A.P., Van Bortel L.M., Boutouyrie P., Cockcroft J.R., McEniery C.M., Protogerou A.D., Roman M.J., Safar M.E., Segers P., Smulyan H. Role of pulse pressure amplification in arterial hypertension: experts' opinion and review of the data. Hypertension.54(2):375-383 (2009).

Barrett K.V., McCurley A.T., Jaffe I.Z. Direct contribution of vascular mineralocorticoid receptors to blood pressure regulation. Clin Exp Pharmacol Physiol.40:902–909 (2013).

Bauer A., Mylroie H., Thornton C.C., Calay D., Birdsey G.M., Kiprianos A.P., Wilson G.K., Soares M.P., Yin X., Mayr M., Randi A.M., Mason J.C. Identification of cyclins A1, E1 and vimentin as downstream targets of heme oxygenase-1 in vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. Sci Rep.8;6:29417:1-16 (2016).

Bellien J., Favre J., Iacob M., Gao J., Thuillez C., Richard V., Joannidès R. Arterial stiffness is regulated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor during changes in blood flow in humans. Hypertension.55(3):674-680 (2010).

Belmadani S., Bernal J., Wei C.C., Pallero M.A., Dell'italia L., Murphy-Ullrich J.E., Berecek K.H. A thrombospondin-1 antagonist of transforming growth factor-beta activation blocks cardiomyopathy in rats with diabetes and elevated angiotensin II. Am J Pathol.171(3):777-789 (2007).

Belmadani S., Zerfaoui M., Boulares H.A., Palen D.I., Matrougui K. Microvessel vascular smooth muscle cells contribute to collagen type I deposition through ERK1/2 MAP kinase, alphavbeta3-integrin, and TGF-beta1 in response to ANG II and high glucose. Am J Physiol Heart Circ Physiol.295(1):H69-76 (2008).

Benetos A., Adamopoulos C., Bureau J.M., Temmar M., Labat C., Bean K., Thomas F., Pannier B., Asmar R., Zureik M., Safar M., Guize L. Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period. Circulation.12;105(10):1202-1207 (2002).

Berner P.F., Frank E., Holtzer H., Somlyo A.P. The intermediate filament proteins of rabbit vascular smooth muscle: immunofluorescent studies of desmin and vimentin. Journal of Muscle Research and Cell Motility.2:439–452 (1981).

Bernini G., Galetta F., Franzoni F., Bardini M., Taurino C., Bernardini M., Ghiadoni L., Bernini M., Santoro G., Salvetti A. Arterial stiffness, intimamedia thickness and carotid artery fibrosis in patients with primary aldosteronism. J Hypertens.26:2399–2405 (2008).

Bézie Y., Daniel Lamazière J-M.., Laurent S., Challande P., Sa Cunha R., Bonnet J., Lacolley P. Fibronectin Expression and Aortic Wall Elastic Modulus in Spontaneously Hypertensive Rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol.18(7):1027-1034 (1998).

Bhattacharya R., Gonzalez A.M., Debiase P.J., Trejo H.E., Goldman R.D., Flitney F.W., Jones J.C. Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength. J Cell Sci.1;122(Pt 9):1390-1400 (2009).

Birukova A.A., Smurova K., Birukov K.G., Kaibuchi K., Garcia J.G., Verin A.D. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. Microvasc Res 67:64–77 (2004).

Bivalacqua T.J., Champion H.C., De Witt B.J., Saavedra J.E., Hrabie J.A., Keefer L.K., Kadowitz P.J. Analysis of vasodilator responses to novel nitric oxide donors in the hindquarters vascular bed of the cat. J Cardiovasc Pharmacol.38(1):120-129 (2001).

Bos W.J.W., Verrij E., Vincent H.H., Westerhof B.E., Parati G., van Montfrans G.A. How to assess mean blood pressure properly at the brachial artery. J Hypertens.;25:751–755 (2007).

Brown M.J., Hallam J.A., Colucci-Guyon E., Shaw S. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. J Immunol.1;166(11):6640-6646 (2001).

Brown N.J. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. Nat Rev Nephrol.9(8):459-469 (2013).

Bunni M.A., Kramarenko I.I., Walker L., Raymond J.R., Garnovskaya M.N. Role of integrins in angiotensin II-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol.300(3):C647-656 (2011).

Byzova T.V., Rabbani R., D'Souza S.E., Plow E.F. Role of integrin $\alpha_v\beta_3$ in vascular biology. Thromb Haemost.80(5):726-734 (1998).

Cai H., Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res.87(10):840-844 (2000).

Calvier L., Miana M., Reboul P., Cachofeiro V., Martinez-Martinez E., de Boer R.A., Poirier F., Lacolley P., Zannad F., Rossignol P. *et al*. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol.33:67-75 (2013).

Centonze V.E. and White J.G. Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging. Biophysical J 75:2015-2024 (1998).

Chapman G.B., Durante W., Hellums J.D., Schafer A.I. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 278(3):H748-754 (2000).

Cheng J., Zhang J., Merched A., Zhang L., Zhang P., Truong L., Boriek A.M., Du J. Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin alphavbeta3 and stablization of PINCH-1. J. Biol. Chem. 282(47):34268-34275 (2007).

Cheng F., Shen Y., Mohanasundaram P., Lindström M., Ivaska J., Ny T., Eriksson J.E. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-β-Slug signaling. Proc Natl Acad Sci U S A.26;113(30):E4320-4327 (2016).

Coleman KR., Braden G.A., Willingham M.C., Sane D.C. Vitaxin, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (alphavbeta3), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. Circ Res.11;84(11):1268-1276 (1999).

Comper D. Wayne. Extracellular Matrix. Vol. 2 – Molecular components and interactions. Routledge, 2nd edition : 384 p (1996).

Conroy K.P., Kitto L.J., Henderson N.C. αv integrins: key regulators of tissue fibrosis. Cell Tissue Res.365(3):511-519 (2016).

Cooper J.N., Tepper P., Barinas-Mitchell E., Woodard G.A., Sutton-Tyrrell K. Serum aldosterone is associated with inflammation and aortic stiffness in normotensive overweight and obese young adults. Clin Exp Hypertens.34:63–70 (2012).

Cordes K.R., Sheehy N.T., White M.P., Berry E.C., Morton S.U., Muth A.N. *et al*. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. Nature.460:705–710 (2009).

Davis M.J., Wu X., Nurkiewicz T.R., Kawasaki J., Davis G.E., Hill M.A., Meininger G.A. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280: H1427–H1433 (2001).

Davis-Dusenbery B.N., Wu C., Hata A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol;31: 2370–2377 (2011).

Davis-Dusenbery B.N., Hata A. Smad-mediated miRNA processing: a critical role for a conserved RNA sequence. RNA Biol.8(1):71-76 (2011).

Delpy E., Coste H., Gouville A.C. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. Br J Pharmacol.119(3):471-478 (1996).

Derkach D.N., Wadekar S.A., Perkins K.B., Rousseau E., Dreiza C.M., Cheung-Flynn J., Ramos H.C., Ugarova T.P., Sheller M.R. RGD-dependent binding of TP508 to integrin alphavbeta3 mediates cell adhesion and induction of nitric oxide. Thromb Haemost.104(1):172-182 (2010).

Dulyaninova N.G., Bresnick A.R. The long myosin light chain kinase is differentially phosphorylated during interphase and mitosis. Exp Cell Res.1;299(2):303-314 (2004).

Dumas D., Henrionnet C., Hupont S., Werkmeister E., Stoltz J.F., Pinzano A., Gillet P. Innovative TCSPC-SHG microscopy imaging to monitor matrix collagen neo-synthetized in bioscaffolds. Biomed Mater Eng.20(3):183-188 (2010).

DuPont J.J., Hill M.A., Bender S.B., Jaisser F., Jaffe I.Z. Aldosterone and vascular mineralocorticoid receptors: regulators of ion channels beyond the kidney. Hypertension. 63(4):632-637 (2014).

Eberth J.F., Popovic N., Gresham V.C., Wilson E., Humphrey J.D. Time course of carotid artery growth and remodeling in response to altered pulsatility. Am J Physiol Heart Circ Physiol.299(6):H1875-1883 (2010).

Eckes B., Dogic D., Colucci-Guyon E., Wang N., Maniotis A., Ingber D., Merckling A., Langa F., Aumailley M., Delouvée A., Koteliansky V., Babinet C., Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. J Cell Sci.111 (Pt 13):1897-1907 (1998).

Eliceiri B.P., Cheresh D.A. Role of alpha v integrins during angiogenesis. Insights into potential mechanisms of action and clinical development. The J. of Clin. Invest. Vol. 103 (9):1227-1230 (1999).

Esue O., Carson A.A., Tseng Y., Wirtz D. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. J Biol Chem.13;281(41):30393-30399 (2006).

Farris A.B., Colvin R.B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. Curr Opin Nephrol Hypertens.21(3):289-300 (2012).

Feng J., Ito M., Nishikawa M., Okinaka T., Isaka N., Hartshorne D.J., Nakano T. Dephosphorylation of distinct sites on the 20 kDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. FEBS Lett 448:101–104 (1999).

Funder J.W., Mihailidou A.S. Aldosterone and mineralocorticoid receptors: clinical studies and basic biology. Mol Cell Endocrinol 301:2–6 (2009).

Funder J.W. Mineralocorticoid receptor antagonists: emerging roles in cardiovascular medicine. Integr Blood Press Control 6:129–138 (2013).

Gabbiani G., Schmid E., Winter S., Chaponnier C., De Ckhastonay C., Vandekerckhove J., Weber K., Franke W.W. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.;78:298–302 (1981).

Galmiche G., Labat C., Mericskay M., Aissa K.A., Blanc J., Retailleau K., Bourhim M., Coletti D., Loufrani L., Gao-Li J., Feil R., Challande P., Henrion D., Decaux J.F., Regnault V., Lacolley P., Li Z. Inactivation of serum response factor contributes to decrease vascular muscular tone and arterial stiffness in mice. Circ Res.29;112(7):1035-1045 (2013).

Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, Challande P, Jaffe IZ, Labat C, Lacolley P, Jaisser F. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. Hypertension 63:520–526 (2014).

Gonzales M., Weksler B., Tsuruta D., Goldman R.D., Yoon K.J., Hopkinson S.B., Flitney F.W., Jones J.C. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. Mol Biol Cell.12(1):85-100 (2001).

Graf K., Neuss M., Stawowy P., Hsueh W.A., Fleck E., Law R.E. Angiotensin II and $\alpha_v\beta3$ integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. Hypertension.35(4):978-984 (2000).

Guo M., Ehrlicher A.J., Mahammad S., Fabich H., Jensen M.H., Moore J.R., Fredberg J.J., Goldman R.D., Weitz D.A. The role of vimentin intermediate filaments in cortical and cytoplasmic mechanics. Biophys J.1;105(7):1562-1568. (2013).

Gustafsson F., Azizi M., Bauersachs J., Jaisser F., Rossignol P. Targeting the aldosterone pathway in cardiovascular disease. Fundam Clin Pharmacol.26(1):135-145 (2012).

Haga J.H., Li Y.J., Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. J Biomech.40(5):947-960 (2007).

Hahm K., Lukashev M.E., Luo Y., Yang W.J., Dolinski B.M., Weinreb P.H., Simon K.J., Chun Wang L., Leone D.R., Lobb R.R., McCrann D.J., Allaire N.E., Horan G.S., Fogo A., Kalluri R., Shield C.F. 3rd, Sheppard D., Gardner H.A., Violette S.M. $\alpha_v\beta_6$ integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. Am J Pathol.170(1):110-125 (2007).

Halka A.T., Turner N.J., Carter A., Ghosh J., Murphy M.O., Kirton J.P., Kielty C.M. and Walker M.G. The effects of stretch on vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. Cardiovasc Pathol 17(2): 98-102 (2008).

Heerkens E.H., Izzard A.S., Heagerty A.M. Integrins, vascular remodeling, and hypertension. Hypertension.49(1):1-4 (2007).

Heerkens E.H., Shaw L., Ryding A., Brooker G., Mullins J.J., Austin C., Ohanian V., Heagerty A.M. alphaV integrins are necessary for eutrophic inward remodeling of small arteries in hypertension. Hypertension.47(2):281-287 (2006).

Heldin C.H., Miyazono K, ten Dijke P. TGF-b signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature 390, 465–471 (1997).

Hellstrand P. and Albinsson S. Stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle: role of the actin cytoskeleton. Can J Physiol Pharmacol 83(10): 869-875 (2005).

Henderson N.C., Iredale J.P. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. Clin Sci (Lond).112(5):265-280 (2007).

Henderson N.C., Arnold T.D., Katamura Y., Giacomini M.M., Rodriguez J.D., McCarty J.H., Pellicoro A., Raschperger E., Betsholtz C., Ruminski P.G., Griggs D.W., Prinsen M.J., Maher J.J., Iredale J.P., Lacy-Hulbert A., Adams R.H., Sheppard D. Targeting of αv integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. Nat Med.19(12):1617-1624 (2013).

Henrion D., Terzi F., Matrougui K., Duriez M., Boulanger C.M., Colucci-Guyon E., Babinet C., Briand P., Friedlander G., Poitevin P., Lévy B.I. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. J Clin Invest. 1;100(11):2909-2914 (1997).

Hermeling E., Hoeks A.P., Winkens M.H., Waltenberger J.L., Reneman R.S., Kroon A.A., Reesink K.D. Noninvasive assessment of arterial stiffness should discriminate between systolic and diastolic pressure ranges. Hypertension.55(1):124-130 (2010).

Hirano K. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca2+ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. J Pharmacol Sci 104:109–115 (2007).

Hoffman B.D., Grashoff C., Schwartz M.A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. Nature.20;475(7356):316-323 (2011).

Huang Y., Qi Y., Du J.Q., Zhang D.F. MicroRNA-34a regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4. Expert Opin Ther Targets.18(12):1355-1365 (2014).

Hudson C.A and Bernal A.Z. Differential phosphorylation or myosin light chain kinase isoforms in human pregnant myometrium in responst to contractile and relaxing agonists. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting and Expo MON-53.06.15–18 (2013).

Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 20;110(6):673-687. Review (2002).

Intengan H.D., Schiffrin E.L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. Hypertension; 36:312–318 (2000).

Intengan H.D., Thibault G., Li J.S., Schiffrin E.L. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. Circulation.30;100(22):2267-2275 (1999).

Isotani E., Zhi G., Lau K.S., Huang J., Mizuno Y., Persechini A., Geguchadze R., Kamm K.E., Stull J.T. Real-time evaluation of myosin light chain kinase activation in smooth muscle tissues from a transgenic calmodulin-biosensor mouse. Proc Natl Acad Sci USA 101:6279–6284 (2004).

Janmey P.A., Euteneuer U., Traub P., Schliwa M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. J Cell Biol.113(1):155-160 (1991).

Ivaska J., Pallari H.M., Nevo J., Eriksson J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. Exp Cell Res.10;313(10):2050-2062 (2007).

Izmiryan A., Franco C.A., Paulin D., Li Z., Xue Z. Synemin isoforms during mouse development: multiplicity of partners in vascular and neuronal systems. Exp Cell Res. 10;315(5):769-783 (2009).

Jacobi J., Maas R., Cordasic N., Koch K., Schmieder R.E., Böger R.H., Hilgers K.F. Role of asymmetric dimethylarginine for angiotensin II-induced target organ damage in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol.294(2):H1058-1066 (2008).

Jaffe I.Z. and Mendelsohn M.E. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocortocoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. Circ Res 96:643–650 (2005).

Jaisser F., Farman N. Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. Pharmacol Rev.68(1):49-75 (2016).

Jenkins R.G., Su X., Su G., Scotton C.J., Camerer E., Laurent G.J., Davis G.E., Chambers R.C., Matthay M.A., Sheppard D. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury. J Clin Invest. 116(6):1606-1614 (2006).

Johansson B., Eriksson A., Virtanen I., Thornell L.E. Intermediate filament proteins in adult human arteries. The Anatomical Record.;247:439–448 (1997).

Kakou A., Bézie Y., Mercier N., Louis H., Labat C., Challande P., Lacolley P., Safar M.E. Selective reduction of central pulse pressure under angiotensin blockage in SHR: role of the fibronectin-alpha5beta1 integrin complex. Am J Hypertens.;22:711–717 (2009).

Kanda S., Kuzuya M., Ramos M.A., Koike T., Yoshino K., Ikeda S., Iguchi A. Matrix metalloproteinase and αvβ3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice. Arterioscler Thromb Vasc Biol.20(4):998-1005 (2000).

Kang Y.Y., Wang J.G.The J-Curve Phenomenon in Hypertension. Pulse (Basel).4(1):49-60 (2016).

Kappert K., Blaschke F., Meehan W.P., Kawano H., Grill M., Fleck E., Hsueh W.A., Law R.E., Graf K. Integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. Basic Res Cardiol. 96(1):42-49 (2001).

Kawano H., Cody R.J., Graf K., Goetze S., Kawano Y., Schnee J., Law R.E., Hsueh W.A. Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. Hypertension.35(1 Pt 2):273-279 (2000).

Khanamiryan L., Li Z., Paulin D., Xue Z. Self-assembly incompetence of synemin is related to the property of its head and rod domains. Biochemistry 9;47(36):9531-9539 (2008).

Kinlay S., Creager M. A., Fukumoto M., Hikita H., Fang J. C., Selwyn A. P. and Ganz P. Endothelium-derived nitric oxide regulates arterial elasticity in human arteries in vivo. Hypertension 38(5): 1049-1053 (2001).

Kreis S., Schönfeld H.J., Melchior C., Steiner B., Kieffer N. The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin alpha2/beta1 cytoplasmic tail complex and co-localizes with native alpha2/beta1 in endothelial cell focal adhesions. Exp Cell Res. 15;305(1):110-121 (2005).

Labat C., Lacolley P., Lajemi M., de Gasparo M., Safar M.E., Benetos A. Effects of valsartan on mechanical properties of the carotid artery in spontaneously hypertensive rats under high-salt diet. Hypertension.38(3):439-443 (2001).

Lacy-Hulbert A., Smith A.M., Tissire H., Barry M., Crowley D., Bronson R.T., Roes J.T., Savill J.S., Hynes R.O. Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid alphav integrins. Proc Natl Acad Sci U S A.2;104(40):15823-15828 (2007).
Lacolley P., Challande P., Boumaza S., Cohuet G., Laurent S., Boutouyrie P., Grimaud J.-A., Paulin D., Lamazière J.-M., Li Z. Mechanical properties and structure of carotid arteries in mice lacking desmin. Cardiovasc Res. 51(1):178-187 (2001).

Lacolley P., Labat C., Pujol A., Delcayre C., Benetos A., Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. Circulation; 106:2848–2853 (2002).

Lacolley P., Babuty D., Boulanger C., Loriand G. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux, John Libbey, Eurotext, 712 p. (2007).

Lacolley P., Regnault V., Nicoletti A., Li Z., Michel J.B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. Cardiovasc Res. 15;95(2):194-204 (2012).

Laurent S., Cockcroft J., Van Bortel L., Boutouyrie P., Giannattasio C., Hayoz D., Pannier B., Vlachopoulos C., Wilkinson I., Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Eur Heart J;27:2588-2605 (2006).

Lehoux S., Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. J Biomech. 36 (5):631-643 (2003).

Leopold J.A., Dam A., Maron B.A., Scribner A.W., Liao R., Handy D.E., Stanton R.C., Pitt B., Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Nat Med, 13:189-197 (2007).

Levy D.G., Rocha R., Funder J.W.(2004) Distinguishing the antihypertensive and electrolyte effects of eplerenone. J Clin Endocrinol Metab 89:2736–2740 (2004).

Li G., Jin R., Norris R.A., Zhang L., Yu S., Wu F., Markwald R.R., Nanda A., Conway S.J., Smyth S.S., Granger D.N. Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. Atherosclerosis.208(2):358-365 (2010).

Li J., Wang R., Tang D.D. Vimentin dephosphorylation at ser-56 is regulated by type 1 protein phosphatase in smooth muscle. Respir Res.25;17(1):91.1-11 (2016).

Li Z., Parlakian A., Coletti D., Alonso-Martin S., Hourdé C., Joanne P., Gao-Li J., Blanc J., Ferry A., Paulin D., Xue Z., Agbulut O. Synemin acts as a regulator of signalling molecules during skeletal muscle hypertrophy. J Cell Sci.1;127 (Pt 21):4589-4601 (2014).

Lin Y.H., Lin L.Y., Chen A., Wu X.M., Lee J.K., Su T.C., Wu V.C., Chueh S.C., Lin W.C., Lo M.T., Wang P.C., Ho Y.L., Wu K.D.; TAIPAI Study Group. Adrenalectomy improves increased carotid intima-media thickness and arterial stiffness in patients with aldosterone producing adenoma. Atherosclerosis.;221:154–159 (2012).

Liu T., Guevara O.E., Warburton R.R., Hill N.S., Gaestel M., Kayyali U.S. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. Am J Physiol Cell Physiol. 299(2):C363-373 (2010).

Liu T., Ghamloush M.M., Aldawood A., Warburton R., Toksoz D., Hill N.S., Tang D.D., Kayyali U.S. Modulating endothelial barrier function by targeting vimentin phosphorylation. J Cell Physiol. 229(10):1484-1493 (2014).

Loufrani L., Retailleau K., Bocquet A., Dumont O., Danker K., Louis H., Lacolley P., Henrion D. Key role of alpha(1)beta(1)-integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294(4):H1906-1913 (2008).

Louis H., Kakou A., Regnault V., Labat C., Bressenot A., Gao-Li J., Gardner H., Thornton S.N., Challande P., Li Z., Lacolley P. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(4): H2597-604 (2007).

Lu Y.B., Iandiev I., Hollborn M., Körber N., Ulbricht E., Hirrlinger P.G., Pannicke T., Wei E.Q., Bringmann A., Wolburg H., Wilhelmsson U., Pekny M., Wiedemann P., Reichenbach A., Käs J.A. Reactive glial cells: increased stiffness correlates with increased intermediate filament expression. FASEB J. 25(2):624-631 (2011).

Ma L, Xu J, Coulombe PA, Wirtz D. Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. J Biol Chem. 2;274(27):19145-19151 (1999).

Ma H., He Q., Dou D., Zheng X., Ying L., Wu Y., Raj J.U., Gao Y. Increased degradation of MYPT1 contributes to the development of tolerance to nitric oxide in porcine pulmonary artery. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.299(1):L117-123 (2010).

Mack C.P., Somlyo A.V., Hautmann M., Somlyo A.P., Owens G.K. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. J Biol Chem. 5;276(1):341-347 (2001).

Madala S.K., Korfhagen T.R., Schmidt S., Davidson C., Edukulla R., Ikegami M., Violette S.M., Weinreb P.H., Sheppard D., Hardie W.D. Inhibition of the αvβ6 integrin leads to limited alteration of TGF-α-induced pulmonary fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.15;306(8):L726-735 (2014).

Maegdefessel L., Rayner K.J., Leeper N.J. MicroRNA regulation of vascular smooth muscle function and phenotype: early career committee contribution. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 35(1):2-6 (2015).

Martinez-Lemus L.A., Crow T., Davis M.J., Meininger G.A. $\alpha_v\beta_3$- and α5β1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. Am J Physiol Heart Circ Physiol 289: H322–H329 (2005).

Martufi G., Gasser T.C. A constitutive model for vascular tissue that integrates fibril, fiber and continuum levels with application to the isotropic and passive properties of the infrarenal aorta. J Biomech.23;44(14):2544-2550 (2011).

Martufi G., Gasser T.C. Turnover of fibrillar collagen in soft biological tissue with application to the expansion of abdominal aortic aneurysms. J R Soc Interface. 7;9(77):3366-3377 (2012).

Mancia G., De Backer G., Dominiczak A., Cifkova R., Fagard R., Germano G., Grassi G., Heagerty A.M., Kjeldsen S.E., Laurent S., Narkiewicz K., Ruilope L., Rynkiewicz A., Schmieder R.E., Struijker Boudier H.A., Zanchetti A., Vahanian A., Camm J., De Caterina R., Dean V., Dickstein K., Filippatos G., Funck-Brentano C., Hellemans I., Kristensen S.D., McGregor K., Sechtem U., Silber S., Tendera M., Widimsky P., Zamorano J.L., Erdine S., Kiowski W., Agabiti-Rosei E., Ambrosioni E., Lindholm L.H., Manolis A., Nilsson P.M., Redon J., Struijker-Boudier H.A., Viigimaa M., Adamopoulos S., Bertomeu V., Clement D., Farsang C., Gaita D., Lip G., Mallion J.M., Manolis A.J., O'Brien E., Ponikowski P., Ruschitzka F., Tamargo J., van Zwieten P., Waeber B., Williams B., The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of H, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of C. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J.;28:1462-1536 (2007).

Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D.E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. Proc Natl Acad Sci U S A.4;94(3):849-854 (1997).

Mao X., Said R., Louis H., Max J.P., Bourhim M., Challande P., Wahl D., Li Z., Regnault V., Lacolley P. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin αvβ3 pathway. Cardiovasc Res.1;96(3):513-523 (2012).

McCarty J.H., Lacy-Hulbert A., Charest A., Bronson R.T., Crowley D., Housman D., Savill J., Roes J., Hynes R.O. Selective ablation of alphav integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. Development. 132(1):165-176 (2005).

McCurley A., Pires P.W., Bender S.B., Aronovitz M., Zhao M.J., Metzger D., Chambon P., Hill M.A., Dorrance A.M., Mendelsohn M.E., Jaffe I.Z. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. Nat Med 18:1429–1433 (2012).

McCurley A., Jaffe I.Z. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. Mol. Cell. Endocrinol.; 350: 256–265 (2012).

Meininger G.A. The central importance of the cytoskeleton for increased cell stiffness in cardiovascular disease. Focus on “Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation”Am J Physiol Cell Physiol 307: C908–C909 (2014).

Mendelsohn M.E. In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter. J Clin Invest 115:840–844 (2005).

Mendez M.G., Kojima S., Goldman R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. FASEB J. 24(6):1838-1851 (2010).

Mendez M.G., Restle D., Janmey P.A. Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. Biophys J.15;107(2):314-323 (2014).

Mercier N., Osborne-Pellegrin M., El Hadri K., Kakou A., Labat C., Loufrani L., Henrion D., Challande P., Jalkanen S., Fève B., Lacolley P. Carotid arterial stiffness, elastic fibre network

and vasoreactivity in semicarbazide-sensitive amine-oxidase null mouse. Cardiovasc. Res. 72 349–357 (2006).
Miao Y., Yang M., Zheng J., Wang L., Du J. Role of Akt1 in Cardiac Fibrosis Induced by Angiotensin II Am J Hypertens. 26 (11): 1635 (2013).

Michel J.B., Li Z., Lacolley P. Smooth muscle cells and vascular diseases. Cardiovasc Res. 15;95(2):135-137 (2012).

Mitchell G.F., Hwang S.J., Vasan R.S., Larson M.G., Pencina M.J., Hamburg N.M., Vita J.A., Levy D., Benjamin E.J. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. Circulation. 2;121(4):505-511 (2010).

Munger J.S., Huang X., Kawakatsu H., Griffiths M.J., Dalton S.L., Wu J., Pittet J.F., Kaminski N., Garat C., Matthay M.A., Rifkin D.B., Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. Cell. 5;96(3):319-328 (1999).

Nagata D., Takahashi M., Sawai K., Tagami T., Usui T., Shimatsu A., Hirata Y., Naruse M. Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. Hypertension.48(1):165-171 (2006).

Nakagawa M., Fukata M., Yamaga M., Itoh N., Kaibuchi K. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. J Cell Sci. 114(Pt 10) :1829-1838 (2001).

Nayak M.T., Singh A., Desai R.S., Vanaki S.S. Immunohistochemical analysis of vimentin in oral submucous fibrosis. J Cancer Epidemiol.;2013:549041.1-6 (2013).

Nehme J.A., Lacolley P., Labat C., Challande P., Robidel E., Perret C., Leenhardt A., Safar M.E., Delcayre C., Milliez P. Spironolactone improves carotid artery fibrosis and distensibility in rat post-ischaemic heart failure. J Mol Cell Cardiol.;39:511–519 (2005).

Nehme J., Mercier N., Labat C., Benetos A., Safar M.E., Delcayre C., Lacolley P. Differences between cardiac and arterial fibrosis and stiffness in aldosterone-salt rats: effect of eplerenone. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.;7:31–39 (2006).

Nichols W., O'Rourke M., Vlachopoulos C. McDonald's Blood Flow in Arteries, Sixth Edition: Theoretical, Experimental and Clinical Principles. CRC Press, 768p (2011).

Nicholson W. T., Vaa B., Hesse C., Eisenach J. H. and Joyner M. J. Aging is associated with reduced prostacyclin-mediated dilation in the human forearm. Hypertension 53(6): 973-978 (2009).

Nguyen Dinh Cat A., Griol-Charhbili V., Loufrani L., Labat C., Benjamin L., Farman N., Lacolley P., Henrion D., Jaisser F. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. FASEB J : Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 24:2454–2463 (2010).

Nguyen Dinh Cat A., Jaisser F. Extrarenal effects of aldosterone. Curr Opin Nephrol Hypertens 21:147–156 (2012).

Nieminen M., Henttinen T., Merinen M., Marttila-Ichihara F., Eriksson J.E., Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. Nat Cell Biol.8(2):156-162 (2006).
O'Rourke M.F., Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. J Am Coll Cardiol.3;50(1):1-13 (2007).

O'Rourke M.F., Safar M.E. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. Hypertension.46(1):200-204 (2005).

O'Rourke M.F., Staessen J.A., Vlachopoulos C., Duprez D., Plante G.E. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. Am J Hypertens.15(5):426-444 (2002).

Ofek G., Wiltz D.C., Athanasiou K.A. Contribution of the cytoskeleton to the compressive properties and recovery behavior of single cells. Biophys J. 7;97(7):1873-1882 (2009).

Osborn M., Caselitz J., Puschel K., Weber K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology.;411:449–458 (1987).

Osborn M., Caselitz J., Weber K. Heterogeneity of intermediate filament expression in vascular smooth muscle: a gradient in desmin positive cells from the rat aortic arch to the level of the arteria iliaca communis. Differentiation.;20(3):196-202 (1981).

Osmanagic-Myers S., Rus S., Wolfram M., Brunner D., Goldmann W.H., Bonakdar N., Fischer I., Reipert S., Zuzuarregui A., Walko G., Wiche G. Plectin reinforces vascular integrity by mediating crosstalk between the vimentin and the actin networks. J Cell Sci. 15;128 (22): 4138-4150 (2015).

Owens G.K., Kumar M.S., Wamhoff B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. Physiol Rev.84(3):767-801 (2004).

Pardali E., Goumans M.J., ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. Trends Cell Biol.20(9):556-567 (2010).

Paul M., Skalli O. Synemin: Molecular Features and the Use of Proximity Ligation Assay to Study Its Interactions. Methods Enzymol.;568:537-555 (2016).

Pruthi D., McCurley A., Aronovitz M., Galayda C., Karumanchi S.A., Jaffe I.Z. Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. ArteriosclerThromb Vasc Biol 34:355–364 (2014).

Qiu H., Zhu Y., Sun Z., Trzeciakowski J.P., Gansner M., Depre C., Resuello R.R., Natividad F.F., Hunter W.C., Genin G.M., Elson E.L., Vatner D.E., Meininger G.A., Vatner S.F. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. Circ Res.3;107(5):615-619 (2010).

Qu M., Liu B., Wang H., Yan Z., Shen B., Jiang Z. Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. J. Vasc. Res. 44(5):345-353 (2007).

Regan C.P., Adam P.J., Madsen C.S. and Owens G.K. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. J Clin Invest 106(9): 1139-1147 (2000).

Rensen S.S., Doevendans P.A., van Eys G.J. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. Neth Heart J. ;15(3):100-108 (2007).
Resch M., Schmid P., Amann K., Fredersdorf S., Weil J., Schach C., Birner C., Griese D.P., Kreuzer P, Brunner S, Luchner A, Riegger GA, Endemann DH. Eplerenone prevents salt-induced vascular stiffness in Zucker diabetic fatty rats: a preliminary report. Cardiovasc Diabetol.;10:94.1-9 (2011).

Rickard A.J., Morgan J., Chrissobolis S., Miller A.A., Sobey C.G., Young M.J. Endothelial cell mineralocorticoid receptors regulate deoxycorticosterone/salt-mediated cardiac remodeling and vascular reactivity but not blood pressure. Hypertension, 63:1033-1040 (2014).

Romer L.H., Birukov K.G., Garcia J.G. Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. Circ Res.;98:606-616 (2006).

Rosa J., Somlóová Z., Petrák O., Strauch B., Indra T., Senitko M., Zelinka T., Holaj R., Widimský J. Jr. Peripheral arterial stiffness in primary aldosteronism. Physiol Res.;61:461–468 (2012).

Russell M.A., Lund L.M., Haber R., McKeegan K., Cianciola N., Bond M. The intermediate filament protein, synemin, is an AKAP in the heart. Arch Biochem Biophys.15;456(2):204-215 (2006).

Safar, M., Chamiot-Clerc, P., Dagher, G., Renaud, J.F. Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontenaously hypertensive rats. Hypertension 38:1416-1421 (2001).

Safar M.E., Blacher J., Jankowski P. Arterial stiffness, pulse pressure, and cardiovascular disease - Is it possible to break the vicious circle? Atherosclerosis;218:263-271 (2011).

Safar M.E. and Lacolley P. Disturbance of macro- and microcirculation: relations with pulse pressure and cardiac organ damage. Am J Physiol Heart Circ Physiol 293: H1–H7 (2007).

Sainz J.M., Reche C., Rábano M.A., Mondillo C., Patrignani Z.J., Macarulla J.M., Pignataro O.P., Trueba M. Effects of nitric oxide on aldosterone synthesis and nitric oxide synthase activity in glomerulosa cells from bovine adrenal gland. Endocrine. 24(1):61-71 (2004).

Schäfer N., Lohmann C., Winnik S., van Tits L.J., Miranda M.X., Vergopoulos A., Ruschitzka F., Nussberger J., Berger S., Luscher T.F., Verrey F., Matter C.M. Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. Eur Heart J. April 17.3515-3524 (2013).

Schiffers P.M.H., Henrion D., Boulanger C.M., Colucci-Guyon E., Langa-Vuves F., Van Essen H., Fazzi G.E., Lévy B.I., De Mey J.G.R. Altered Flow–Induced Arterial Remodeling in Vimentin-Deficient Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.;20: 611-616 (2000).

Schürch W., Skalli O., Lagacé R., Seemayer T.A., Gabbiani G. Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft-tissue tumor differentiation and origin. III. Hemangiopericytomas and glomus tumors. Am J Pathol. 136(4):771-786 (1990).

Schyvens C.G., Cowden W.B., Zhang Y., McKenzie K.U., Whitworth J.A. Hemodynamic effects of the nitric oxide donor DETA/NO in mice. Clin Exp Hypertens. 26(6):525-535 (2004).
Sebé-Pedrós A., Roger A.J., Lang F.B., King N., Ruiz-Trillo I. Ancient origin of the integrin-mediated adhesion and signaling machinery. Proc Natl Acad Sci U S A. 1;107(22):10142-10147 (2010).

Sehgel N.L., Vatner S.F., Meininger G.A. "Smooth Muscle Cell Stiffness Syndrome"-Revisiting the Structural Basis of Arterial Stiffness. Front Physiol. 18;6:335.1-15 (2015).

Shaw A. and Xu Q. Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. Curr Vasc Pharmacol 1(1): 41-58 (2003).

Shimizu H., Ito M., Miyahara M., Ichikawa K., Okubo S., Konishi T., Naka M., Tanaka T., Hirano K., Hartshorne D.J. and Nakano T. Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. J Biol Chem 269:30407–30411 (1994).

Schmierer B. and Hill C.S. TGFb–SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 970–982 (2007).

Small J.V., Gimona M. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. Acta Physiol Scand. 164(4):341-8 (1998).

Sridaran D., Ramamoorthi G., MahaboobKhan R., Kumpati P. Oxystressed tumor microenvironment potentiates epithelial to mesenchymal transition and alters cellular bioenergetics towards cancer progression. Tumor Biol. 26.1-16 (2016).

Stawski L., Haines P., Fine A., Rudnicka L., Trojanowska M. MMP-12 deficiency attenuates angiotensin II-induced vascular injury, M2 macrophage accumulation, and skin and heart fibrosis. PLoS One. 10;9(10):e109763.1-14 (2014).

Steinert P.M., Marekov L.N., Parry D.A. Molecular parameters of type IV alpha-internexin and type IV-type III alpha-internexin-vimentin copolymer intermediate filaments. J Biol Chem. 15;274(3):1657-1666 (1999).

Stouffer G.A., Smyth S.S. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Nov 1;23(11):1971-1978 (2003).

Štrauch B., Petrák O., Wichterle D., Zelinka T., Holaj R., Widimský J. Jr. Increased arterial wall stiffness in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. Am J Hypertens.;19:909–914 (2006).

Su B.Y., Shontz K.M., Flavahan N.A. and Nowicki P.T. The effect of phenotype on mechanical stretch-induced vascular smooth muscle cell apoptosis. JVasc Res 43(3): 229-37 (2006).

Sudano I.,Roas S., Noll G.Vascularabnormalities inessentialhypertension. Curr.Pharm.Des. 17,3039–3044 (2011).

Sun Z., Martinez-Lemus L.A., Hill M.A., Meininger G.A. Extracellular matrix-specific focal adhesions in vascular smooth muscle produce mechanically active adhesion sites. Am J Physiol Cell Physiol.;295:C268-278 (2008).

Takaki A., Morikawa K., Tsutsui M., Murayama Y., Tekes E., Yamagishi H., Ohashi J., Yada T., Yanagihara N., Shimokawa H. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. J Exp Med.1;205(9):2053-2063 (2008).
Takeda Y. Effects of eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist, on clinical and experimental salt-sensitive hypertension. Hypertens Res 32:321–324 (2009).

Tang D.D. Intermediate filaments in smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 294 (4):C869-878 (2008).

Tardy Y., Meister J.J., Perret F., Brunner H.R., Arditi M. Non-invasive estimate of the mechanical properties of peripheral arteries from ultrasonic and photoplethysmographic measurements. Clin Phys Physiol Meas. 12(1):39-54 (1991).

Tedgui A., Lévy B. Biologie de la paroi artérielle - aspects normaux et pathologiques. Paris : Masson 87 p (1994).

Ten Dijke P. and Arthur H.M. Extracellular control of TGFb signalling in vascular development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 857–869 (2007).

Terzi F., Henrion D., Colucci-Guyon E., Federici P., Babinet C., Levy B.I., Briand P., Friedlander G. Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. J Clin Invest. 15;100(6):1520-1528 (1997).

Triggle C. R., Samuel S.M., Ravishankar S., Marei I., Arunachalam G., Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. Can. J. Physiol. Pharmacol. 90, 713–738 (2012).

Tsuruta D., Jones J.C. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. J Cell Sci. 15;116(Pt 24):4977-4984 (2003).

Turner C.J., Badu-Nkansah K., Crowley D., van der Flier A., Hynes R.O. α5 and αv integrins cooperate to regulate vascular smooth muscle and neural crest functions in vivo. Development. 15;142(4):797-808 (2015).

Ushiki T. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. Archives of Histology and Cytology, 65 (2):109–126 (2002).

Van Agthoven J.F., Xiong J.P., Alonso J.L., Rui X., Adair B.D., Goodman S.L., Arnaout M.A. Structural basis for pure antagonism of integrin αVβ3 by a high-affinity form of fibronectin. Nat Struct Mol Biol. 21(4):383-388 (2014).

Van der Flier A., Badu-Nkansah K., Whittaker C.A., Crowley D., Bronson R.T., Lacy-Hulbert A., Hynes R.O. Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development. Development. 137(14):2439-2449 (2010).

Van der Loo B., Schildknecht S., Zee R. and Bachschmid M. M. Signalling processes in endothelial ageing in relation to chronic oxidative stress and their potential therapeutic implications in humans. Exp Physiol 94(3): 305-310 (2009).

Varga J., Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest. 117(3):557-567 (2007).

Waitkus-Edwards K.R., Martinez-Lemus L.A., Wu X., Trzeciakowski J.P., Davis M.J., Davis G.E., Meininger G.A. α4β1-Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. Circ Res 90: 473–480 (2002).

Wang N., Stamenović D. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. Am J Physiol Cell Physiol. 279(1):C188-194 (2000).

Watanabe H., Tran Q.K., Takeuchi K., Fukao M., Liu M.Y., Kanno M., Hayashi T., Iguchi A., Seto M., Ohashi K. Myosin light-chain kinase regulates endothelial calcium entry and endothelium-dependent vasodilation. FASEB J. 15(2):282-284 (2001).

Wede O.K., Löfgren M., Li Z., Paulin D. and Arner A. Mechanical function of intermediate filaments in arteries of different size examined using desmin deficient mice. J Physiol. 1; 540(Pt 3): 941–949 (2002).

Wei J., Xu G., Wu M., Zhang Y., Li Q., Liu P., Zhu T., Song A., Zhao L., Han Z., Chen G., Wang S., Meng L., Zhou J., Lu Y., Wang S., Ma D. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. Anticancer Res.28(1A):327-334 (2008).

Werkmeister E., de Isla N., Marchal L., Stoltz J.F., Dumas D. Interest of second harmonic generation imaging for diagnosis in thick and opaque tissue. Biorheology. 45(3-4):375-383 (2008).

Werkmeister E., de Isla N., Netter P., Stoltz J.F., Dumas D. Collagenous extracellular matrix of cartilage submitted to mechanical forces studied by second harmonic generation microscopy. Photochem Photobiol. 86(2):302-310 (2010).

Werkmeister E., Kerdjoudj H., Marchal L., Stoltz J.F., Dumas D. Multiphoton microscopy for blood vessel imaging: new non-invasive tools (Spectral, SHG, FLIM). Clin Hemorheol Microcirc. 37(1-2):77-88 (2007).

Wernig F., Mayr M., Xu Q. Mechanical stretch-induced apoptosis in smooth muscle cells is mediated by beta1-integrin signaling pathways. Hypertension. 41(4):903-911 (2003).

Westby C. M., Weil B. R., Greiner J. J., Stauffer B. L. and DeSouza C. A. Endothelin-1 vasoconstriction and the age-related decline in endothelium-dependent vasodilatation in men. Clin Sci (Lond) 120(11): 485-491 (2011).

Westhoff M.A., Serrels B., Fincham V.J., Frame M.C., Carragher N.O. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. Mol Cell Biol. 24(18):8113-8133 (2004).

Wong S. L., Wong W. T., Tian X. Y., Lau C. W. and Huang Y. Prostaglandins in action indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. Adv Pharmacol 60: 61-83 (2010).

Wu X., Mogford J.E., Platts S.H., Davis G.E., Meininger G.A., Davis M.J. Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alphav beta3 and alpha5 beta1 integrin ligands. J Cell Biol. 5;143(1):241-252 (1998).

Wu X., Davis G.E., Meininger G.A., Wilson E., Davis M.J. Regulation of the L-type calcium channel by alpha5beta1 integrin requires signalling between focal adhesion proteins. J Biol Chem 276: 30285–30292 (2001).

Xiao Q., Zeng L., Zhang Z., Hu Y., Xu Q. Stem cell-derived Sca-1+ progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin alpha1/beta1/alphav and PDGF receptor pathways. Am J Physiol Cell Physiol. 292(1):C342-352 (2007).

Xin M., Small E.M., Sutherland L.B., Qi X., McAnally J., Plato C.F. *et al*. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. Genes Dev;23:2166–2178 (2009).

Xiong J.P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S.L., Arnaout M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. Science. 5;296(5565):151-155 (2002).

Xu C., Zarins C.K., Pannaraj P.S., Bassiouny H.S., Glagov S. Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(12):2566-2572 (2000).

Xue Z.G., Cheraud Y., Brocheriou V., Izmiryan A., Titeux M., Paulin D., Li Z. The mouse synemin gene encodes three intermediate filament proteins generated by alternative exon usage and different open reading frames. Exp Cell Res. 15;298(2):431-444 (2004).

Zieman S.J., Melenovsky V., Kass D.A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25(5):932-943 (2005).

Zipfel W.R., Williams R.M., Christie R., Nikitin A.Y., Hyman B.T., Webb W.W. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. Proc Natl Acad Sci U S A. 10;100(12):7075-7080 (2003).

Zhou Y., Peng H., Ji Q., Qi J., Zhu Z., Yang C. Discovery of small molecule inhibitors of integrin alphavbeta3 through structure-based virtual screening. Bioorg Med Chem Lett. 15;16(22):5878-5882 (2006).

Zhu J., Motejlek K., Wang D., Zang K., Schmidt A., Reichardt L.F. Beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. Development. 129(12):2891-2903 (2002).

# ANNEXE

Pflugers Arch - Eur J Physiol (2015) 467:1643–1650
DOI 10.1007/s00424-014-1616-x

INTEGRATIVE PHYSIOLOGY

# Role of smooth muscle cell mineralocorticoid receptor in vascular tone

**Antoine Tarjus · Ekaterina Belozertseva · Huguette Louis · Soumaya El Moghrabi · Carlos Labat · Patrick Lacolley · Frédéric Jaisser · Guillaume Galmiche**

Received: 18 February 2014 / Revised: 15 September 2014 / Accepted: 16 September 2014 / Published online: 30 September 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Identification of the mineralocorticoid receptor (MR) in the vasculature (i.e., endothelial and smooth muscle cells) raised the question of its role in vascular function and blood pressure control. Using a mouse model with conditional inactivation of MR in vascular smooth muscle cell (VSMC) ($MR^{SMKO}$), we have recently shown that the VSMC MR is crucial for aldosterone-salt-induced carotid stiffening. In the present study, we have investigated the specific contribution of the VSMC MR in the regulation of vascular tone in large vessels. In $MR^{SMKO}$ mice, contractions induced by potassium chloride and calcium ($Ca^{2+}$) are decreased in the aorta, whereas contraction is normal in response to phenylephrine and caffeine. The difference in response to $Ca^{2+}$ suggests that the VSMC-specific deficiency of the MR modifies VSM $Ca^{2+}$ signaling but without altering the intracellular $Ca^{2+}$ store handling. The relaxation induced by acetylcholine is not affected by the absence of MR. However, the relaxation induced by Ach in the presence of indomethacin and the relaxation induced by sodium nitroprussiate are significantly reduced in $MR^{SMKO}$ mice compared to controls. Since endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity is increased in mutant mice, their altered relaxation reflects impairment of the nitric oxide (NO) signaling pathway. In addition to altered NO and $Ca^{2+}$ signaling, the activity of myosin light chain and its regulators, myosin light chain kinase (MLCK) and myosin phosphatase (MLCP), is reduced. In conclusion, MR expressed in VSMC is required for NO and $Ca^{2+}$ signaling pathways and contractile protein activity leading to an altered contraction/relaxation coupling.

**Keywords** Aldosterone · Aorta · Contractility · Relaxation · Transgenic mice

Frédéric Jaisser and Guillaume Galmiche equally contributed to this study.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00424-014-1616-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Tarjus · S. El Moghrabi · F. Jaisser (✉) · G. Galmiche
Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm U1138 Team 1, 15 rue de l'Ecole de Médecine, Paris Cedex 06 75270, France
e-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

A. Tarjus · S. El Moghrabi · F. Jaisser · G. Galmiche
Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

E. Belozertseva · H. Louis · C. Labat · P. Lacolley
Faculté de Médecine, INSERM U961, 9 Avenue de la Fôret de Haye, Vandoeuvre-lès-Nancy 54500, France

F. Jaisser
Centre for Clinical Investigation, INSERM U9501, CHU Brabois, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

## Introduction

The mineralocorticoid receptor (MR) is known to participate in blood pressure (BP) regulation through the control of renal sodium homeostasis and extracellular volume [9]. Thereby, MR antagonists (MRA) have been proved to be an effective treatment for hypertension in experimental models [23] and in patients [8, 23]. Recently, the mechanism of action of MR on BP has been questioned. A meta-analysis of clinical trials demonstrated that BP reduction with MR antagonist does not correlate with changes in plasma electrolytes and, by extension, with renal MR activation [14]. The results are coherent with the growing evidence suggesting that BP could be regulated via vascular tone and not only the kidney [16]. Consistently with this new picture, it has been found that, besides its classical expression in the aldosterone-sensitive distal nephron (ASDN), MR is also expressed in

the vasculature, both in the endothelium [19] and in vascular smooth muscle cells (VSMC) [15].

These results raise the question of the implication of MR in the vascular function and particularly in vascular tone and arterial stiffness. Targeted inactivation of MR in VSM was recently achieved using two animal models with conditional MR inactivation in the VSMCs [11, 15]. VSM MR inactivation blunts the age-induced raise of BP [15], without affecting sodium homeostasis in the kidney of adult mice [11]. Moreover, VSM MR inactivation underlined the critical role of MR expressed in VSM for arterial stiffness: VSMC MR expression is necessary for increased arterial stiffness in response to aldosterone and high salt by modulation of cell-matrix attachment proteins independent of major vascular structural changes [11]. The role of VSM in vascular tone has been explored in mesenteric arteries using inducible VSM KO mice underlying a role of VSM MR in modulating $Ca^{2+}$ channel expression. However, how VSM MR affects the contractile machinery remains unknown. In the present study, we investigated the mechanisms by which MR expressed in SMC affects the vascular response, focusing on endothelial-dependent and endothelial-independent pathways affecting relaxation-contraction coupling.

## Methods

### Generation of VSMC-specific MR inactivation

The generation of the $MR^{SMKO}$ ($MR^{fl/fl}$;SM22-Cre) allowing VSMC-specific MR inactivation in the vasculature has been described previously [11]. For all studies, males $MR^{SMKO}$ and their littermates, $MR^{fl/fl}$ mice (control mice, CTL), were phenotyped at age 4–5 months. All animal breeding, housing, and protocols were performed in accordance with the ethical guidelines of INSERM for the care and use of laboratory animals.

### Vascular reactivity analysis

Vascular contractile and relaxing responses were assessed in isolated abdominal aortas from male $MR^{SMKO}$ and CTL mice as previously described [10]. Briefly, aortas were excised, cut into 2.5-mm segments and mounted in a Mulvany-Halpern wire myograph [17] (DMT, Aarhus, DK) in a 8-mL organ bath containing physiological salt solution (PSS, pH 7.4) continuously bubbled with carbogen (95 % $O_2$, 5 % $CO_2$) and maintained at 37 °C. When required by the experimental protocol, the endothelial layer was removed by gently rubbing the intimal surface of the vessels with the myograph wires. Rings were allowed to equilibrate for 30 min at a resting tension of 1 g, with the bath medium changed every 10 min. Administration of $10^{-5}$ mol/L phenylephrine (PE) was used to test arterial viability, and the presence of intact endothelium was verified by a relaxing dose of acetylcholine (Ach, $10^{-4}$ mol/L). The α-adrenergic pathway was assessed via the contraction evoked by PE ($10^{-9}$ to $10^{-5}$ mol/L), while the response to calcium ($Ca^{2+}$) channel activation was determined by direct depolarization of the cell membrane using potassium chloride (KCl) cumulative dose-response curves (10 to 80 mmol/L). In order to assess the extracellular calcium response, aortic rings were first preincubated in $Ca^{2+}$-free solution (containing 80 mmol/L KCl instead of an equimolar amount of NaCl) with 2 mmol/L EGTA added for 20 min and then in $Ca^{2+}$-free solution containing no EGTA. $CaCl_2$ was then added from a stock solution to obtain the requested concentrations ($10^{-5}$ to $10^{-2}$ mol/L), and the effect of each $Ca^{2+}$ concentration was recorded. The calcium release from sarcoplasmic reticulum via ryanodine receptor channels was assessed by a bolus of caffeine ($10^{-2}$ mol/L).

To evaluate endothelium-dependent relaxation, the dose-response to Ach ($10^{-9}$ to $10^{-6}$ mol/L) was determined in intact rings precontracted by $10^{-5}$ mol/L of PE. The endothelium-dependent relaxation induced by endogenous prostacyclin ($PGI_2$) was assessed by the dose-response to Ach in the presence of $N_\omega$-nitro-L-arginine ($10^{-4}$ mol/L, L-NNA), a nitric oxide (NO) inhibitor, (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The endothelium-dependent relaxation induced by endogenous NO was assessed by the dose-response to Ach in the presence of indomethacin (Indo, $10^{-5}$ mol/L), an inhibitor of cyclooxygenase (COX) 1 and 2 enzymes. The VSMC sensitivity (endothelium-independent relaxation) to NO and $PGI_2$ pathways was also assessed in endothelium-denuded rings precontracted with PE ($10^{-5}$ mol/L) by dose-responses to a NO donor sodium nitroprussiate (SNP, $10^{-9}$ to $10^{-5}$ mol/L) and to treprostinil, a synthetic analog of $PGI_2$ (Trep, $10^{-9}$ to $10^{-5}$ mol/L), respectively. VSMC sensitivity to cGMP was assessed by a single dose of cGMP analog 8-Br-cGMP ($10^{-4}$ mol/L) in endothelium-denuded rings precontracted with PE ($10^{-5}$ mol/L). The maximal response ($E_{max}$) and the concentration of agonist inducing 50 % of maximal responses ($EC_{50}$) were interpolated from the individual concentration-effect curves. These latter values were transformed into $pD_2$ values, that is, negative logarithms of $EC_{50}$ values.

### Western blotting analysis

Western blot analysis was performed on protein collected from the aorta from control and $MR^{SMKO}$ mice that were immediately homogenized after dissection using a 1 % SDS homogenization buffer with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Extracts were centrifuged at 13,200 rpm for 20 min at 4 °C and supernatants were frozen. Twenty micrograms of total proteins diluted with Laemmli buffer (2×, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) and heated at 95 °C for 5 min were loaded on

4–15 % Mini-PROTEAN® TGX™ precast polyacrylamide gels (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and then transferred to PVDF membranes. The antibodies are listed in Online Resource 1 (Table S1).

### RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was extracted from aortic arteries by using the TRIzol® reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The reverse transcription of messenger RNA (mRNA) (100 ng) was performed with SuperScript II Reverse Transcriptase KIT (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Transcript levels of genes were analyzed by real-time PCR (fluorescence detection of SYBR Green) in an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). For each sample, mRNA levels normalized the geometric mean of the amount of two housekeeping genes, 18s and hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (Hprt). The analyzed genes and their specific primer sequences are listed in Online Resource 1 (Table S2).

### Statistical analysis

Values are expressed as mean±standard error of the mean (SEM). mRNA and protein expressions were analyzed using unpaired Student's *t* test. Vascular reactivity experiments were analyzed using one-way ANOVA, and the Fisher's LSD post hoc test was used for intergroup comparisons. An unpaired Student's *t* test was used for the relaxations in response to SNP, treprostinil, and Ach in the presence of indomethacin. Differences were considered significant at values of $P<0.05$.

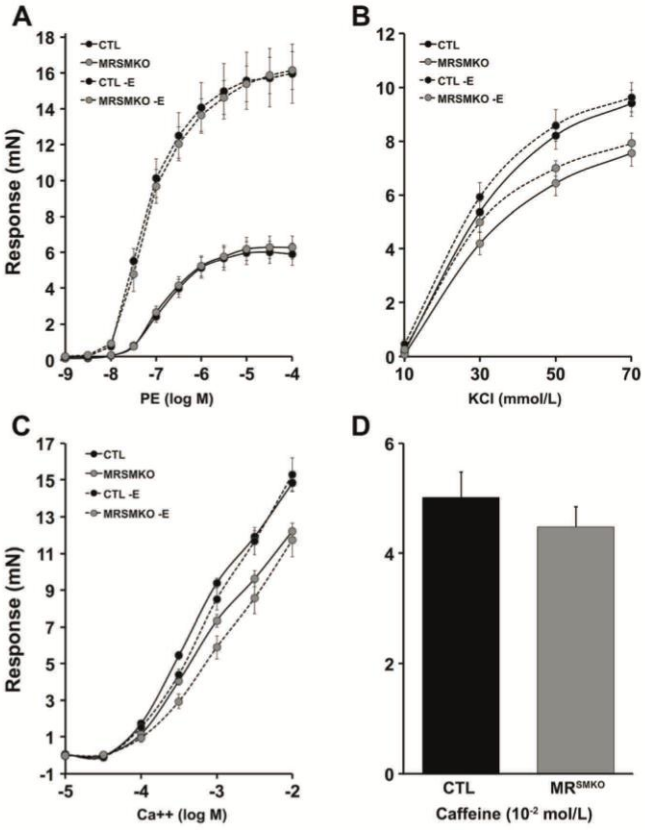



**Fig. 1** Vascular responses to vasoconstrictors in $MR^{SMKO}$ and control (*CTL*) mice. **a** Contraction induced by different concentrations of PE in intact and endothelium-denuded aortic rings from CTL ($n$=17 and 5, respectively) and $MR^{SMKO}$ ($n$=15 and 5, respectively) mice. **b** Contraction induced by different concentrations of KCl in intact and endothelium-denuded aortic rings from CTL and $MR^{SMKO}$ mice ($n$=5/group). **c** Contraction induced by different concentrations of $Ca^{2+}$ in intact and endothelium-denuded aortic rings from CTL ($n$=10 and 5, respectively) and $MR^{SMKO}$ ($n$=10 and 5, respectively) mice. **d** Contraction induced by a single dose of caffeine ($10^{-2}$ M) in endothelium-denuded aortic rings from CTL ($n$=5) and $MR^{SMKO}$ ($n$=5) mice. The *error bars* represent SEM

## Results

### VSMC-specific inactivation of the MR affects $Ca^{2+}$ and NO signaling in SMCs

PE-induced maximal contraction and sensitivity were similar between $MR^{SMKO}$ and control intact rings (Fig. 1a, Table 1). As expected, the absence of endothelium led to an increase in $E_{max}$ and $pD_2$ in response to PE in CTL mice. Similar result was observed in $MR^{SMKO}$ mice (Fig. 1a, Table 1). Thus, the de-endothelialization of aortas increased the sensitivity to PE in a similar manner in both genotypes (Fig. 1a, Table 1). To test agonist-independent VSMC contraction, we next analyzed the KCl and $Ca^{2+}$ responses. The maximal contractions induced by KCl and $Ca^{2+}$ were significantly lower in $MR^{SMKO}$ compared to CTL intact rings (Fig. 1b, c, Table 1). This difference is maintained despite endothelium removal (Fig. 1b, c, Table 1). Caffeine-induced contraction related to sarcoplasmic $Ca^{2+}$ release is similar between in $MR^{SMKO}$ and CTL mice (4.48±0.36 and 5.02±0.46, respectively), suggesting that intracellular $Ca^{2+}$ store handling were not altered (Fig. 1d). Taken together, this suggests that VSMC MR KO is associated with altered response to extracellular $Ca^{2+}$.

The $E_{max}$ and $pD_2$ in response to Ach-induced relaxation were similar in aortic rings of the two groups (Fig. 2a, Table 1). To specifically study the NO-mediated vasodilation in the absence of the prostanoid pathway, Ach-mediated relaxation was studied in the presence of indomethacin. Relaxation was significantly lower in $MR^{SMKO}$ than CTL mice (Fig. 2b, Table 1). The endothelium-dependent relaxation related to endogenous $PGI_2$ was evaluated in the presence of a NO inhibitor, L-NNA. In these conditions, the Ach-induced relaxation was modest and similar between $MR^{SMKO}$ and CTL mice (Fig. 2b, Table 1).

The VSMC vasodilatory response to NO and $PGI_2$ was assessed by the dose-response to the NO donor SNP and to the

**Table 1** Contraction and relaxation responses in aortas of control and MRSMKO mice

| Contraction | Number of mice | $E_{max}$ (mN) | $pD_2$ |
|---|---|---|---|
| PE | | | |
| CTL+E | 17 | 06.00±0.66 | −6.68±0.06 |
| MRSMKO+E | 15 | 06.16±0.64 | −6.73±0.04 |
| CTL-E | 5 | 15.76±1.66### | −7.18±0.04 |
| MRSMKO-E | 5 | 15.93±1.05### | −7.10±0.08 |
| KCl | | | |
| CTL+E | 5 | 9.41±0.49 | −1.60±0.01 |
| MRSMKO+E | 5 | 7.55±0.48* | −1.58±0.01 |
| CTL-E | 5 | 9.63±0.55 | −1.62±0.01 |
| MRSMKO-E | 5 | 7.91±0.39* | −1.62±0.01 |
| $Ca^{2+}$ | | | |
| CTL+E | 10 | 14.84±0.41 | −3.23±0.02 |
| MRSMKO+E | 10 | 12.22±0.45*** | −3.15±0.02* |
| CTL-E | 5 | 15.30±0.92 | −3.08±0.02### |
| MRSMKO-E | 5 | 11.73±0.94** | −2.96±0.03*### |
| **Relaxation** | **Number of mice** | **$E_{max}$ (mN)** | **$pD_2$** |
| ACh | | | |
| Untreated CTL | 13 | 60±5 | −7.66±0.09 |
| Untreated MRSMKO | 10 | 61±6 | −7.69±0.14 |
| CTL+Indo | 5 | 96±2 | −7.43±0.07 |
| MRSMKO+indo | 5 | 83±2°° | −7.22±0.06° |
| CTL+L-NNA | 5 | 24±6### | −7.35±0.15 |
| MRSMKO+L-NNA | 6 | 24±10### | −7.40±0.17 |
| SNP | | | |
| CTL-E | 5 | 97±1 | −7.72±0.11 |
| MRSMKO-E | 5 | 86±4* | −7.31±0.10* |
| Treprostinil | | | |
| CTL-E | 6 | 34±5 | −7.19±0.32 |
| MRSMKO-E | 5 | 27±5 | −7.21±0.20 |
| 8-Br-cGMP | | | |
| CTL-E | 4 | 73±2 | – |
| MRSMKO-E | 4 | 77±3 | – |

Data are means±SEM

*+E* intact rings, *−E* de-endothelialized rings, $E_{max}$ maximal efficiency, $pD_2$ negative logarithms of the concentration required to produce 50 % contraction or relaxation in response to pharmaceutical agents, *PE* phenylephrine, $Ca^{2+}$ calcium ion, *ACh* acetylcholine, *Indo* indomethacin, *SNP* sodium nitroprussiate, *8-Br-cGMP* 8-bromoadenosine 3′,5′-cyclic monophosphate

*$P<0.05$; **$P<0.01$ versus CTL mice; #$P<0.05$; ##$P<0.01$; ###$P<0.001$ versus +E or untreated condition; °°$P<0.01$ versus CTL mice (Student's *t* test)

$PGI_2$ analog treprostinil, respectively. In $MR^{SMKO}$ aortic rings, relaxation induced by SNP was reduced compared to CTL (Fig. 2c, Table 1), while treprostinil induces a modest and similar relaxation between two groups (Fig. 2c, Table 1).

Taken together, these results suggested that the altered response to SNP may be related to altered cGMP production. To bypass the cGMP production, we next tested the relaxation induced by 8-Br-cGMP, a stable analog of cGMP. The relaxation induced by 8-Br-cGMP was similar in both $MR^{SMKO}$ and CTL rings (Fig. 2d). Western blot analysis showed that the eNOS activity (estimated by the phospho-eNOS/total-eNOS ratio) was increased in the aorta from $MR^{SMKO}$ compared with that from CTL mice (percent of control level; Fig. 3). Taken together, this suggests that VSMC MR KO is associated with altered NO-dependent relaxation related to altered VSMC NO response associated with a compensatory eNOS activation. In contrast, the endogenous $PGI_2$ synthesis and the sensitivity of SMC to $PGI_2$ were not altered in $MR^{SMKO}$ mice.

### VSMC MR is crucial for the tonic control of the activity of the contractile apparatus

The loss of MR in VSMC does not alter the mRNA expression of genes involved in the VSMC contraction such as the actomyosin complex [SM α-actin (Actg2), SM myosin heavy chain (Myh11), Myosin light polypeptide 9, regulatory (Myl9), smoothelin (Smtnβ), desmin (Des), and cofilin (Cfl2)] or signaling pathways such as ras homolog gene family (RhoA, member A), protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A (Ppp1r14a or CPI-17), guanylyl cyclase a1 (Guca1a)], and ion channels/transporters [ATPase, $Ca^{2+}$ transporting (Atp2a2), calcium release-activated calcium modulator 2 (Orai2), $Na^+/Ca^{2+}$ exchanger (Ncx), L-type calcium channel (Cacna1 or Cav1.2), and transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1 (Trpc1)], as shown in Online Resource 1, Fig. S1. The expression of the proteins involved in the actomyosin complex such as smooth muscle α-actin (αSMA) and myosin light chain 2 (MLC2) was similar in both groups, as well as contraction regulators such as the myosin light chain kinase (MLCK), the myosin phosphatase-targeting subunit 1 (MYPT1), a subunit of the myosin light chain phosphatase (MLCP), the serine/threonine-protein kinase (PAK1), and calmodulin (CaM) (Fig. 3 and Online Resource 1, Fig. S2). However, the phosphorylation of MLCK at serine 1760 and MLC2 at serine 19 was decreased (Fig. 3 and Online Resource 1, Fig. S2). This led to a decrease in the ratio of phosphorylated protein over total protein (*p*-MLCK/*t*-MLCK and *p*-MLC2/*t*-MLC2) in $MR^{SMKO}$ mice, whereas the *p*-PAK1/*t*-PAK1 ratio was not affected (Fig. 3). The *p*-$MYPT1^{Thr853}$/MYPT1 ratio was also decreased (Fig. 3).

## Discussion

In the present study, we analyzed the role of VSMC MR in endothelial-dependent and endothelial-independent pathways

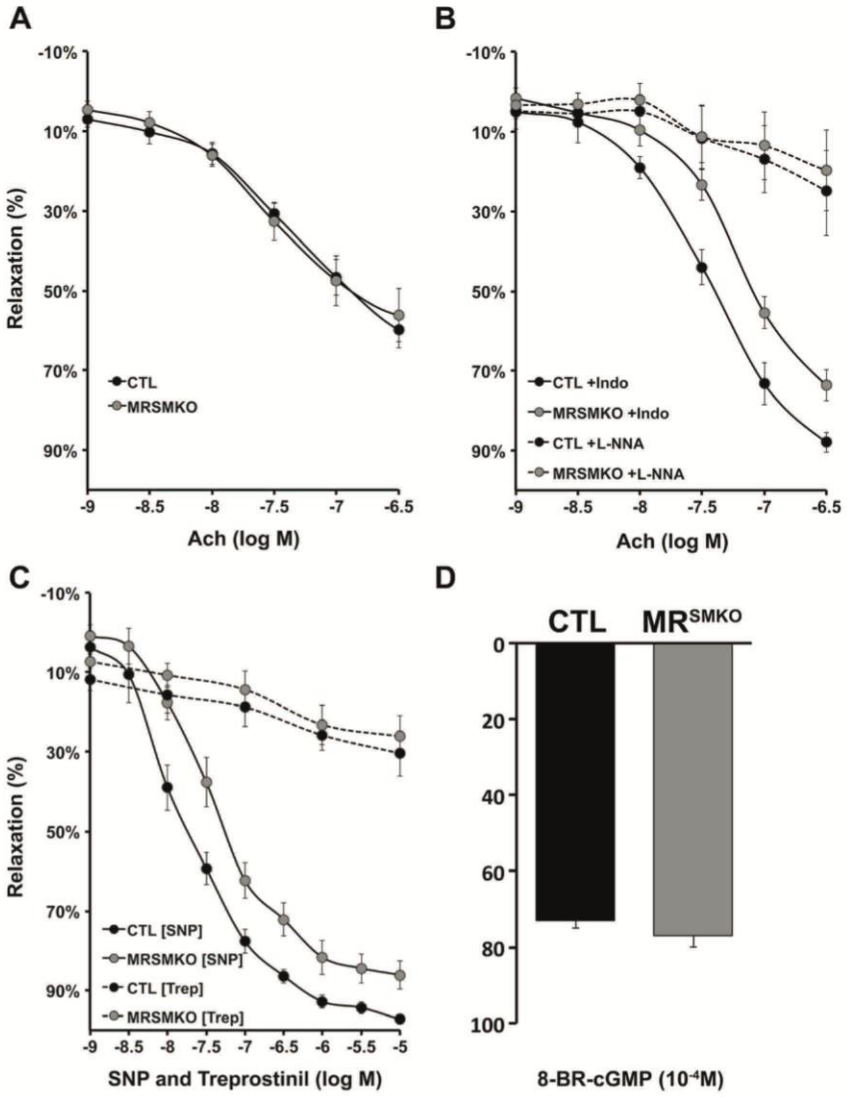



**Fig. 2** Vascular responses to vasodilators in $MR^{SMKO}$ and control (*CTL*) mice. **a** Endothelium-dependent relaxation induced by different concentrations of acetylcholine (*ACh*) in intact aortic rings from CTL ($n$=6) and $MR^{SMKO}$ ($n$=5) mice. **b** Endothelium-dependent relaxation induced by different concentrations of Ach in the presence of either an inhibitor of cyclooxygenase 1 and 2, indomethacin (*full line*), or a NO inhibitor, L-NNA (*dotted line*), in intact aortic rings from CTL ($n$=5 and 5, respectively) and $MR^{SMKO}$ ($n$=5 and 6, respectively) mice. **c** Endothelium-independent relaxation induced by different concentrations of the NO donor sodium nitroprussiate (*SNP*) (*full line*) and endothelium-independent relaxation induced by different concentrations of the synthetic analog of $PGI_2$ (*dotted line*), in endothelium-denuded aortic rings from CTL ($n$=5 and 6, respectively) and $MR^{SMKO}$ ($n$=5 and 5, respectively) mice. **d** Endothelium-independent relaxation in response to 8-bromocyclic GMP ($10^{-4}$ mol/L) in endothelium-denuded aortic rings from $MR^{SMKO}$ ($n$=4) and control ($n$=4) mice. The *error bars* represent SEM. $^{**}P<0.01$ versus CTL mice

affecting relaxation-contraction coupling. While PE-induced vasoconstriction was not affected, the KCl and $Ca^{2+}$ response was clearly blunted in $MR^{SMKO}$ mice. Moreover, NO-dependent vasodilation induced by Ach (in the presence of the eicosanoid inhibitor indomethacin) or the NO donor SNP was also blunted. In contrast, the response to endogenous or exogenous $PGI_2$ is not altered in $MR^{SMKO}$ mice. The basal phosphorylation status of major VSMC contractile proteins (commonly used as surrogate estimation of their activity) was decreased in $MR^{SMKO}$ mice as compared to littermate controls indicating that VSMC MR expression is required for tonic activation of the VSMC contractile apparatus in vivo. The implication of VSMC MR in the vasoactive response to PE has been previously studied in conditional mouse model with inducible MR inactivation in VSMC. Interestingly, abnormal vasoactive response was observed only in aged mice, while short-term MR inactivation for 2 months has no effects [15]. Using a non-inducible (constitutive) model, we do not confirm these results despite a lag time of MR inactivation similar to the aged VSM KO mice used in the previous study [15]. The vasoactive response to PE was independent of the endothelium and similar to those previously observed in mutant mice with a short-term MR inactivation [15]. These phenotypic differences may be the consequences of a variable duration of MR inactivation at a specific age or the influence of the VSMC MR before its inactivation. McCurley et al. [15] reported a blunted vasoconstrictive response to the Cav1.2 agonist BayK8644, suggesting a default in the $Ca^{2+}$ channel Cav1.2 expression/activity. Whether the $Ca^{2+}$ channel Cav1.2 is involved in the cascade as proposed by McCurley et al. [15] is difficult to assess in the absence of patch clamp studies analyzing Cav1.2 activity. While we do not confirm in our model the decrease in mRNA expression of the Cav1.2 subunit that was previously reported by these authors, we showed that the vasoconstrictive response to an increase in external $Ca^{2+}$ is blunted in constitutive $MR^{SMKO}$ mice when compared to control mice. Of note, the sarcoplasmic $Ca^{2+}$ release was not modified: We showed that caffeine-induced contraction

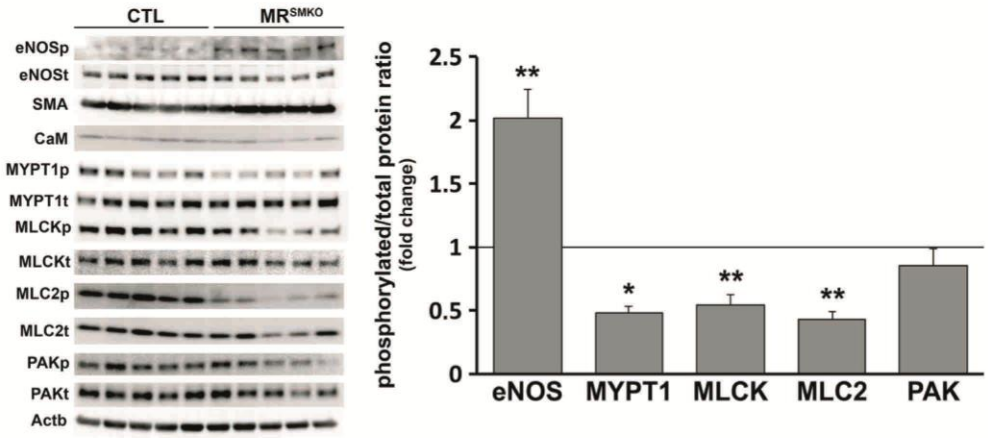



**Fig. 3** Smooth muscle-specific protein expression in $MR^{SMKO}$ aortas. Western blot of phosphorylated and total protein of eNOS, myosin light chain 2 (*MLC2*), and its regulators, the myosin light chain kinase (*MLCK*) and the myosin phosphatase-targeting subunit 1 (*MYPT1*) as well serine/threonine-protein kinase PAK1. Representative Western blot (*upper panel*) and phosphorylated/total protein ratio (*lower panel*). Level of CTL is set at 1. The *error bars* represent SEM. $n=5$ mice in both two groups. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ versus CTL mice

was similar in both groups, suggesting that intracellular $Ca^{2+}$ store handling was not involved in the altered extracellular calcium response.

The presence of a blunted response to the NO donor SNP clearly demonstrated a reduction of NO-dependent relaxation at the level of VSMC. In our model, the Ach-

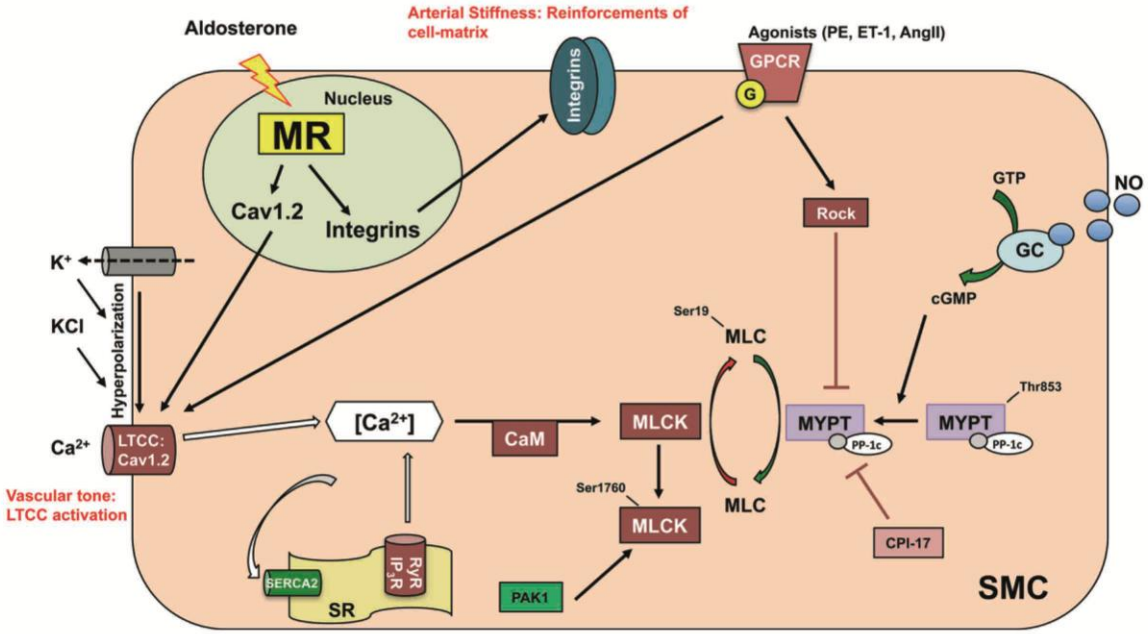



**Fig. 4** Potential role for smooth muscle cell (*SMC*) mineralocorticoid receptors (*MR*) in vascular tone and stiffness (adapted of Barrett et al.) [2]. The SMC MR regulates vascular expression/activity of the LTCC (*Cav1.2*) and integrins, thereby contributing to vascular tone and arterial stiffness, particularly when ageing. SM myosin requires phosphorylation at ser 19 of the MLC2 to reach significant levels of actin-activated myosin ATPase activity. Contractile agonists, including phenylephrine (*PE*), endothelin 1 (*ET-1*), and angiotensin II (*AngII*), induce SMC contraction by the phosphorylation of myosin (*MLC2*). The phosphorylation of MLC2 is controlled by MLCK that can be activated in a $Ca^{2+}$/calmodulin-dependent and $Ca^{2+}$-independent manner. Phosphorylation of MLCK at serine 1760 by PKA/PAK1 inhibits the actin-activated ATPase of myosin by reducing its affinity for actin [13]. Nitric oxide synthetized into the endothelium diffuses to SMC, where it activates soluble guanylyl cyclase (*sGC*) to produce cGMP, thereby facilitating myosin dephosphorylation by the myosin light chain phosphatase (*MLCP*), resulting in SMC relaxation. MLCP is composed of a catalytic subunit, pp1c delta, a regulatory subunit MYPT1 and a small 20-kDa subunit of unknown function [12]. MLCP activity can be regulated by the dual function protein, MYPT1, that functions either as an activator of MLCP by targeting the MLCP complex to its substrate MLC2 [22], or as an MLCP inhibitor when MYPT1 is phosphorylated on one or both of its two phosphorylation sites (T696 and T853) [7]. Phosphorylation of MYPT1 at Thr853 by Rho-associated kinase (*Rock*) results in phosphatase (*MLCP*) inhibition enhancing the contractile response [3]. Another MLCP inhibitor is CPI-17 that acts as an MLCP pseudosubstrate when phosphorylated, thereby competing with MLC

induced relaxation appears normal, while the inhibition of the prostanoid pathways unmasked a blunted vasodilatory response to Ach, suggesting an impairment of the NO signaling pathway. In addition, we reported in the present study that the activity of eNOS (as estimated by the *p*-eNOS/total-eNOS ratio) was increased by twofold in $MR^{SMKO}$ mice, suggesting a possible compensatory mechanism to escape the relative NO-insensitivity. The normal response to endogenous $PGI_2$ (tested in the presence of L-NNA) and to exogenous $PGI_2$ (tested in the presence of the $PGI_2$ analog treprostinil) in $MR^{SMKO}$ mice indicated that this compensatory mechanism is not linked to increased prostanoid synthesis/action. Indomethacin alters the maximal contractile response to PE [1]. Consequently, it was not possible to obtain the same preconstruction between control and $MR^{SMKO}$ mice with the same concentration of PE in both groups (data not shown). This effect by itself could explain the larger Ach-induced relaxation seen in control mice compared to $MR^{SMKO}$ mice. Note that the role of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) has not been assessed in this study. Indeed, it was demonstrated that the endothelium-dependent relaxation to Ach involves either NO or the combination of NO plus a product of cyclooxygenase but not EDHF in mice aorta [4]. The underlying mechanism of the altered response to NO is unclear. Since the relaxation induced by a cGMP analog 8-Br-cGMP was similar in both $MR^{SMKO}$ and CTL rings, a decreased guanylate cyclase expression at the protein level (despite the unchanged mRNA expression) or activity may explain the decreased response to the NO donor SNP.

The decreased activity of the downstream contractile machinery is also a consequence of VSM MR inactivation (Fig. 4). Our results indicate that genes involved in contractile machinery are not MR transcriptional targets, since mRNA or protein levels of Actg2 (SMA), Myh11, Myl9 (MLC2), Ppp1r14a (CPI-17), and Ppp1r12a (MYPT1) are normal in $MR^{SMKO}$ mice, compared to CTL mice. However, the phosphorylation levels of MLCK, MLC2, and MYPT1 are significantly altered in the mutant mice. The down activation of MLCK and MYPT1 may therefore represent a mechanism explaining the defective vascular response in the arteries of the $MR^{SMKO}$: The down activation of MYPT1 results in a decrease in MLCP activation and thereby may reduce the relaxation, while the altered response to extracellular $Ca^{2+}$ observed in $MR^{SMKO}$ aortas lead to the decrease of the MLCK activity and thus may contribute to impair contraction. These regulatory pathways form a network that tightly regulates MLC2 activity and therefore has a significant impact on the balance between contraction and relaxation.

The role of MR in the VSMC clearly goes beyond the control of vascular reactivity. We recently reported that VSMC MR is mandatory for aldosterone-induced vascular stiffness: Using the same mouse model with constitutive MR inactivation in VSMC, we showed that MR inactivation specifically in VSMC leads to arterial stiffening by modulation of cell-matrix attachment proteins independent of major vascular structural changes (Fig. 4), providing mechanistic insights into the beneficial effects of MR antagonism on vascular stiffness [6, 18]. Within the past years, it became obvious that MR activation exerts a variety of effects (remodeling, inflammation, endothelial dysfunction, vasoconstriction) in the vasculature, which may contribute to its hypertensive action and, more generally, to the pathophysiological consequences of mineralocorticoid excess [20]. Pruthi et al. [21] reported that VSMC MR is necessary for aldosterone-induced vascular remodeling occurring after endothelial injury, which was associated to VSMC proliferation and vascular fibrosis. Both endothelial and VSMC MR are involved in BP (in basal conditions and in response to AngII infusion) [11, 15, 19] in the absence of alteration of renal $Na^+$ homeostasis, pointing on a specific role of MR expressed in the vasculature. Indeed, MR expression can be increased in vessels in some pathological situations such as hypertension [5].

In conclusion, the present study using in vivo cell-specific inactivation of MR in VSMC indicated that VSMC MR modulates vasoreactivity and is crucial for the tonic control of the activity of the contractile apparatus by modulating the NO and $Ca^{2+}$ signaling pathways.

**Funding** This work was supported by the "Institut National pour la Santé et Recherche Médicale" and grants from the "Agence Nationale pour la Recherche" [ANR09-BLAN-0156-01], the "Centre de Recherche Industrielle et Technique," and the Fondation de France. A. Tarjus was recipient of a PhD fellowship of the Université Pierre et Marie Curie. E. Belozertseva was recipient of a PhD fellowship of the "Agence Nationale pour la Recherche" [ANR-13-BSV1-0026-01].

**Conflict of interest** None

## References

1. Alvarez Y, Briones AM, Balfagon G, Alonso MJ, Salaices M (2005) Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. J Hypertens 23: 767–777
2. Barrett KV, McCurley AT, Jaffe IZ (2013) Direct contribution of vascular mineralocorticoid receptors to blood pressure regulation. Clin Exp Pharmacol Physiol 40:902–909. doi:10.1111/1440-1681.12125
3. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JG, Verin AD (2004) Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. Microvasc Res 67:64–77
4. Chataigneau T, Feletou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM (1999) Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. Br J Pharmacol 126:219–226. doi:10.1038/sj.bjp.0702300

5. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW (2004) Enhancement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor density in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat. Microcirculation 11:69–78
6. Duprez DA (2010) Is vascular stiffness a target for therapy? Cardiovasc Drugs Ther 24:305–310. doi:10.1007/s10557-010-6250-z
7. Feng J, Ito M, Nishikawa M, Okinaka T, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T (1999) Dephosphorylation of distinct sites on the 20 kDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. FEBS Lett 448:101–104
8. Funder JW (2013) Mineralocorticoid receptor antagonists: emerging roles in cardiovascular medicine. Integr Blood Press Control 6:129–138. doi:10.2147/ibpc.S13783
9. Funder JW, Mihailidou AS (2009) Aldosterone and mineralocorticoid receptors: clinical studies and basic biology. Mol Cell Endocrinol 301:2–6. doi:10.1016/j.mce.2008.10.029
10. Galmiche G, Labat C, Mericskay M, Aissa KA, Blanc J, Retailleau K, Bourhim M, Coletti D, Loufrani L, Gao-Li J, Feil R, Challande P, Henrion D, Decaux JF, Regnault V, Lacolley P, Li Z (2013) Inactivation of serum response factor contributes to decrease vascular muscular tone and arterial stiffness in mice. Circ Res 112:1035–1045. doi:10.1161/circres.113.301076
11. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S, Challande P, Jaffe IZ, Labat C, Lacolley P, Jaisser F (2014) Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. Hypertension 63:520–526. doi:10.1161/hypertension.113.01967
12. Hirano K (2007) Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca2+ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. J Pharmacol Sci 104:109–115
13. Isotani E, Zhi G, Lau KS, Huang J, Mizuno Y, Persechini A, Geguchadze R, Kamm KE, Stull JT (2004) Real-time evaluation of myosin light chain kinase activation in smooth muscle tissues from a transgenic calmodulin-biosensor mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 101:6279–6284. doi:10.1073/pnas.0308742101
14. Levy DG, Rocha R, Funder JW (2004) Distinguishing the antihypertensive and electrolyte effects of eplerenone. J Clin Endocrinol Metab 89:2736–2740. doi:10.1210/jc.2003-032149
15. McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, Chambon P, Hill MA, Dorrance AM, Mendelsohn ME, Jaffe IZ (2012) Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. Nat Med 18:1429–1433. doi:10.1038/nm.2891
16. Mendelsohn ME (2005) In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter. J Clin Invest 115:840–844. doi:10.1172/jci24806
17. Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res 41:19–26
18. Nehme J, Mercier N, Labat C, Benetos A, Safar ME, Delcayre C, Lacolley P (2006) Differences between cardiac and arterial fibrosis and stiffness in aldosterone-salt rats: effect of eplerenone. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 7:31–39. doi:10.3317/jraas.2006.004
19. Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbili V, Loufrani L, Labat C, Benjamin L, Farman N, Lacolley P, Henrion D, Jaisser F (2010) The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. FASEB J : Off Publ Fed Am Soc Exp Biol 24:2454–2463. doi:10.1096/fj.09-147926
20. Nguyen Dinh Cat A, Jaisser F (2012) Extrarenal effects of aldosterone. Curr Opin Nephrol Hypertens 21:147–156. doi:10.1097/mnh.0b013e32834fb25b
21. Pruthi D, McCurley A, Aronovitz M, Galayda C, Karumanchi SA, Jaffe IZ (2014) Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. Arterioscler Thromb Vasc Biol 34:355–364. doi:10.1161/atvb.113.302854
22. Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ et al (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. J Biol Chem 269:30407–30411
23. Takeda Y (2009) Effects of eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist, on clinical and experimental salt-sensitive hypertension. Hypertens Res 32:321–324. doi:10.1038/hr.2009.29

## Résumé

La rigidité artérielle et la fibrose ont une valeur prédictive dans le développement des maladies cardiovasculaires (CV). Ces 2 phénotypes impliquent les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) notamment des récepteurs membranaires et les protéines du cytosquelette. Les objectifs ont été d'étudier : (i) l'influence du récepteur minéralocorticoïde (MR) sur la réactivité vasculaire, (ii) le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans le développement de la rigidité artérielle et la fibrose vasculaire, et (iii) l'impact de la vimentine et la synémine sur la structure et la fonction artérielle. Ces trois études ont utilisées des souris avec invalidation génétiques des protéines d'intérêt. Résultats : l'absence du MR diminue la réactivité vasculaire en altérant le couplage contraction/relaxation des CMLVs *via* des mécanismes $Ca^{2+}$- et NO-dépendants (une diminution de la vasoconstriction en réponse au $Ca^{2+}$ extracellulaire et une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine). L'invalidation de la sous-unité $\alpha_v$ prévient la fibrose en réponse à l'administration d'angiotensine II. L'absence de la vimentine et non celle de la synémine augmente la rigidité artérielle *via* des changements des adhésions focales des CMLVs mais aussi des cellules endothéliales. En conclusion, les récepteurs membranaires et protéines intracellulaires étudiées influencent la fonction et la structure des artères grâce à des actions spécifiques sur le tonus musculaire, la mécanotransduction et l'organisation ultra-structurale des CMLVs. Ces études montrent au niveau cellulaire et moléculaire le déterminisme plurifactoriel des phénotypes de rigidité-fibrose de la paroi artérielle. Ces résultats nécessitent des travaux plus mécanistiques pour affirmer l'implication de ces protéines dans les maladies CV liées au vieillissement.



**Mots clés :** intégrine $\alpha_v$, cellules musculaires lisses vasculaires, rigidité artérielle, remodelage vasculaire, angiotensine II, fibrose



## Summary

Arterial stiffness and fibrosis have a predictive value in the development of cardiovascular diseases (CV). These two phenotypes involve vascular smooth muscle cells (VSMCs) including membrane receptors and cytoskeletal proteins. The objectives were to examine: (i) the influence of the mineralocorticoid receptor (MR) on vascular reactivity, (ii) the role of $a_vb_3$ integrin in the development of arterial stiffness and vascular fibrosis, and (iii) the impact of vimentin and synemin on arterial structure and function. The mice with genetic invalidation of the proteins of interest were used in these three studies. Results: the absence of MR decreased vascular reactivity by altering the contraction/relaxation coupling of VSMC through $Ca^{2+}$- and NO-dependent mechanisms (a decrease of vasoconstriction in response to extracellular $Ca^{2+}$ and impaired endothelium-dependent vasorelaxation in response to acetylcholine). The invalidation of the $\alpha_v$ subunit prevented fibrosis in response to the administration of angiotensin II. The absence of vimentin, and not that of the synemin, increased arterial stiffness *via* changes in focal adhesions of VSMCs as well as endothelial cells. In conclusion, the studied membrane receptors and intracellular proteins that influenced the structure and function of arteries through specific actions on muscle tone, the mechanotransduction and the ultra-structural organization of VSMCs. These studies show the multifactorial dependency of the stiffness-fibrosis phenotypes of the arterial wall at the cellular and molecular levels. These results require more mechanistic work to determine the role of these proteins in CV diseases related to aging.



**Key words:** alphav intégrine, vascular smooth muscle cells, arterial stiffness, vascular remodeling, angiotensin II, fibrosis