

**THÈSE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

**Marion GAYARD**

-----

*Présentée et soutenue publiquement le 15 septembre 2010*

**ÉTUDE DES ROLES DE LA PHOSPHORYLATION DE RHOA :**  
**NOUVEAUX PARTENAIRES**  
**ET EFFET VASOPROTECTEUR DE L'ESTRADIOL**

**Président :**

M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie Générale et Clinique

**Membres du jury :**

Mme Malvyne ROLLI-DERKINDEREN, Chargée de Recherche CNRS

Mme Chrystelle CARIO-TOUMANIANTZ, Maître de Conférences  
de Physiologie animale

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
<b>I. RhoA et fonctions vasculaires .....</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Structure des vaisseaux .....</b>	<b>2</b>
<b>I.2. Régulation de la contraction de CMLs .....</b>	<b>4</b>
<b>I.3. La petite protéine G RhoA.....</b>	<b>5</b>
a) Structure de RhoA.....	6
b) Régulation de l'activité de RhoA .....	7
c) Effecteurs de RhoA.....	8
d) Fonctions vasculaires de RhoA .....	10
<b>II. L'AMPK, une kinase vasoprotectrice ? .....</b>	<b>12</b>
<b>II.1. Structure de l'AMPK.....</b>	<b>12</b>
<b>II.2. Mécanisme d'activation de l'AMPK .....</b>	<b>13</b>
<b>II.3. Régulation de l'activation de l'AMPK .....</b>	<b>14</b>
<b>II.4. Effets physiologiques de l'AMPK .....</b>	<b>15</b>
a) Rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie énergétique.....	15
b) Protection cardiovasculaire.....	17
<b>III. Les estrogènes.....</b>	<b>19</b>
<b>III.1. Présentation des estrogènes .....</b>	<b>19</b>
<b>III.2. Métabolisme des estrogènes .....</b>	<b>21</b>
<b>III.3. Récepteurs aux estrogènes .....</b>	<b>22</b>
a) Structure des récepteurs .....	22
b) Localisation des récepteurs .....	24
<b>III.4. Mécanisme d'action des estrogènes.....</b>	<b>26</b>
a) « Effets génomiques des estrogènes».....	26
b) « Effets non génomiques des estrogènes ».....	26
<b>III.5. Effets des estrogènes .....</b>	<b>27</b>
a) Effet cardiovasculaire .....	28
b) Effet sur la paroi vasculaire .....	29
MATERIEL ET METHODES .....	31
<b>1. Culture cellulaire .....</b>	<b>31</b>
a. Conditions de culture .....	31
b. Traitement des cellules.....	32
c. Arrêt du traitement.....	32
d. Immunoprécipitation .....	33
e. Analyse par western blot .....	33
f. 2D-Page .....	33
g. Identification des protéines par spectrométrie de masse .....	34
h. Drogues et réactifs .....	34
<b>2. Modèles animaux.....</b>	<b>35</b>
a. Ovariectomie .....	35
b. Prélèvement des aortes.....	35
c. Mesure de la contractio .....	35
<b>3. Analyse statistique .....</b>	<b>36</b>

RESULTATS.....	37
<b>1. Signalisation .....</b>	<b>37</b>
<b>2. Nouveaux partenaires de pRho .....</b>	<b>44</b>
DISCUSSION .....	47
BIBLIOGRAPHIE.....	53

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>ANG II</b>	Angiotensine II
<b>CMLs</b>	Cellules musculaires lisses
<b>CMLVs</b>	Cellules musculaires lisses vasculaires
<b>E2</b>	Estradiol
<b>eNOS</b>	NO synthase endothéliale
<b>ER</b>	Récepteur aux estrogènes
<b>GAPs</b>	GTPase activating proteins
<b>GDI</b>	Guanosine nucleotide dissociation inhibitor
<b>GDP</b>	Guanosine triphosphate
<b>GEFs</b>	Guanosine Nuceotide exchange factors
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>MLC</b>	Myosin light chain
<b>MLCK</b>	Myosin light chain kinase
<b>MLCP</b>	Myosin light chain phosphatase
<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>OVX</b>	Souris ovariectomisées
<b>PKA</b>	Protéine kinase AMPc dépendante
<b>PKG</b>	Protéine kinase GMPc dépendante
<b>ROCK</b>	Rho-kinase
<b>SNP</b>	Sodium Nitroprussiate
<b>WT</b>	Souris sauvages

## INTRODUCTION

Notre équipe est reconnue pour ses travaux sur la petite protéine G RhoA et la voie de signalisation RhoA-Rock, responsable de la sensibilisation au calcium de l'appareil contractile. Outre son implication dans les phénomènes de contraction des cellules musculaires lisses, RhoA contrôle des fonctions majeures au sein des cellules musculaires lisses vasculaires, rendant la régulation de l'activité de la petite protéine G essentielle. Une suractivation de RhoA a ainsi été associée à de nombreuses pathologies vasculaires (Loirand *et al.*, 2006b). Toutefois, les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation responsables de cette suractivation ne sont pas encore bien décrits.

Pour tenter d'expliquer cette suractivation, une partie de notre équipe s'intéresse particulièrement à la régulation des GEFs, protéines responsables de l'activation de RhoA. Une approche différente consiste à émettre l'hypothèse que la suractivation de RhoA associée aux pathologies vasculaires est due à un défaut du système d'inactivation de RhoA, et ainsi à étudier les mécanismes responsables de l'inhibition de la petite protéine G. Une autre partie de l'équipe s'attache donc à étudier les GAPs, inhibiteurs de RhoA, et les mécanismes responsables de la phosphorylation de RhoA. En effet, l'induction de la phosphorylation de RhoA en réponse au monoxyde d'azote ou à la stimulation des récepteurs de type 2 à l'angiotensine II, inhibe RhoA et une de ses cibles majeure Rock. Cette inhibition ralentissant ou inhibant le développement de pathologies vasculaires, il est intéressant de trouver de nouveaux moyens d'induire la phosphorylation de RhoA afin de définir de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique et/ou préventif. De plus, hormis l'inhibition de Rock, les conséquences de la phosphorylation de RhoA sont encore peu connues.

Mon travail s'inscrit dans ce contexte et a tout d'abord comme objectif l'identification de nouvelles kinases de RhoA. L'AMP-activated protein kinase, l'AMPK, est une kinase ubiquitaire indispensable au maintien de l'homéostasie énergétique. Elle possède des effets protecteurs au niveau cardiovasculaire, toutefois son action sur les vaisseaux et notamment le mécanisme par lequel elle est capable de réguler la réactivité vasculaire, restent controversés. De façon intéressante, une étude récente de Goirand montre que l'AMPK possède un effet vasodilatateur endothélium-indépendant (Goirand *et al.*, 2007). Le travail consiste à tester l'hypothèse selon laquelle l'effet vasodilatateur de l'AMPK implique l'inhibition de la voie RhoA-Rock, et plus particulièrement la phosphorylation de RhoA. Nous chercherons ensuite à identifier le ou les activateurs de l'AMPK capables d'induire la phosphorylation de RhoA physiologiquement.

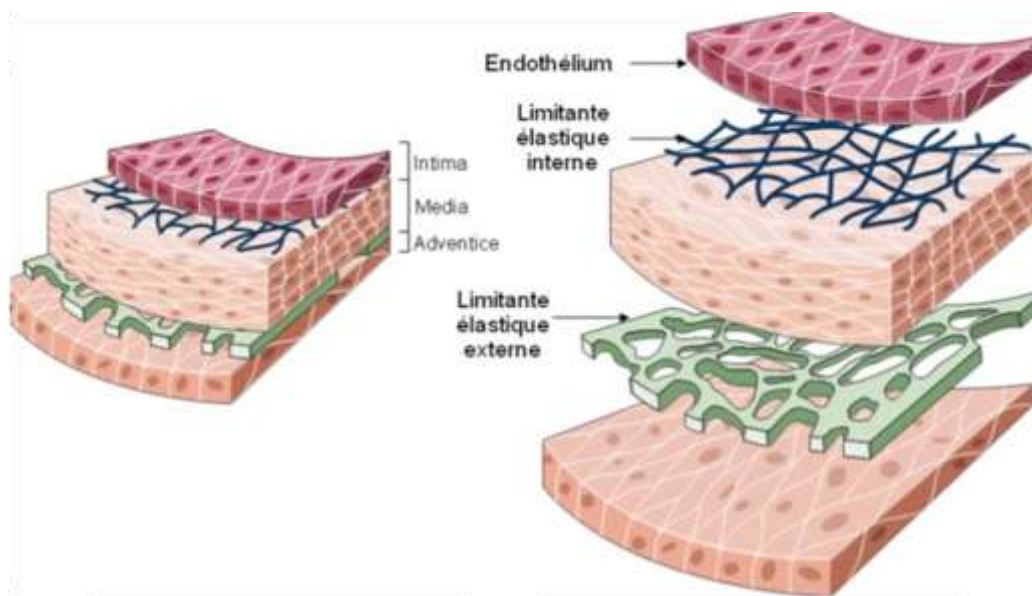
Par la suite, et toujours dans le but de mieux comprendre la régulation de la phosphorylation de RhoA et ses conséquences, une étude des partenaires de la protéine phosphorylée sera menée. Il a en effet déjà été décrit que RhoA phosphorylée possède une affinité augmentée pour deux de ses effecteurs, PKN et mDia (Nusser *et al.*, 2006). Outre son effet sur la réactivité vasculaire, la phosphorylation de la protéine pourrait ainsi intervenir dans la régulation d'autres fonctions physiologiques et l'identification de nouveaux partenaires de RhoA phosphorylée pourrait ainsi permettre leur mise en évidence.

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. RhoA et fonctions vasculaires

#### I.1. Structure des vaisseaux

La paroi vasculaire est constituée de trois couches cellulaires séparées entre elles par les limitantes élastiques internes et externes. De la lumière vers l'extérieur, on trouve successivement l'intima, la media et l'adventice (Figure1).



**Figure1** : Structure des vaisseaux.

L'intima est constituée de l'endothélium, de la membrane basale de la couche sous-endothéliale, et de la limitante élastique interne. Les cellules endothéliales tapissent la surface interne de la paroi et forment une couche continue en contact avec le sang. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées (tight junctions) et des jonctions communicantes (gap junctions) permettant l'échange d'ions, de métabolites et d'autres facteurs de régulations intercellulaires. En cas d'inflammation ou en réponse à des agents vasoactifs comme les catécholamines, l'histamine, la sérotonine, ou l'angiotensine II (Ang II), les cellules endothéliales se contractent grâce à la présence de filaments de myosine, ce qui entraîne un élargissement des espaces intercellulaires et augmente la perméabilité vasculaire. En effet, l'endothélium vasculaire contribue de façon active à de nombreuses fonctions essentielles, dont la régulation de la vasomotricité, la croissance des cellules musculaires

lisses (CMLs), l'agrégation plaquettaire ou encore la réponse inflammatoire. Il possède un rôle régulateur grâce à sa capacité à répondre à divers stimuli autocrines ou paracrines. Ceci s'opère par la présence de nombreux récepteurs membranaires (récepteurs muscariniques, sérotoninergiques, adrénérgiques, récepteurs aux cytokines ou aux hormones de croissance...) ou intracellulaires (récepteurs aux oestrogènes). Les réponses régulatrices peuvent également provenir de stimuli mécaniques tels que la pression artérielle et les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin.

L'adventice est constituée de fibres de collagènes de type I et III, de fibres d'élastine, de fibroblastes, de macrophages, de vaisseaux lymphatiques et de fibres nerveuses. Elle est très développée au niveau des microvaisseaux et peu au niveau des gros vaisseaux.

La média quant à elle contient des CMLs arrangées de manière concentrique et associées entre elles par du tissu conjonctif. La fonction primaire des CMLs vasculaires (CMLVs) est de réguler le diamètre des vaisseaux sanguins. Ces cellules fusiformes et mononuclées sont en effet capables de se contracter grâce à la présence de protéines contractiles, les filaments d'actine et de myosine. Découverte il y a plus de 50 ans, l'actine est une protéine ubiquitaire présente dans toutes les cellules eucaryotes animales et végétales. Elle représente un composant majeur des filaments fins. L'actine monomérique (ou actine G pour Globulaire), formée d'une seule chaîne polypeptidique de 42 kDa, peut polymériser pour former des filaments (actine F pour Filamenteuse). La plupart des eucaryotes supérieurs possèdent diverses isoformes d'actine codées par différents gènes. Les CMLs expriment 4 isoformes d'actine : l'actine musculaire  $\alpha$  et  $\gamma$ , l'actine non-musculaire  $\beta$  et l'isoforme  $\gamma$  cytoplasmique (Gabbiani *et al.*, 1981). La forme  $\alpha$  est prédominante dans les CMLVs puisqu'elle représente 70% de l'actine totale dans ce type cellulaire (Fatigati & Murphy, 1984). Cette protéine s'exprime dans les stades les plus précoces de la vasculogénèse (Mitchell *et al.*, 1990 ; Duband *et al.*, 1993). Au cours du développement, on assiste à la diminution graduelle de l'expression de l'isoforme  $\beta$  parallèlement à l'augmentation de celle de l' $\alpha$ -actine des CMLs. L' $\alpha$ -actine du muscle lisse est ainsi un marqueur des CMLs différenciées (phénotype contractile). Les myosines quant à elles forment une super-famille de protéines dont les propriétés principales sont de se lier à l'actine, d'hydrolyser l'ATP et ainsi de générer un mouvement (Mermall *et al.*, 1998 ; Sellers, 2000). Parmi les quinze familles de myosines qui ont été identifiées, c'est la myosine de classe II qui est présente dans les CMLs. Cette protéine est une enzyme hexamérique constituée de deux chaînes lourdes de 200 kDa environ et de deux chaînes légères dont on retrouve plusieurs isoformes. Dans le cas des CMLs, il existe cinq isoformes de chaînes légères : deux isoformes de MLC<sub>17</sub>, deux isoformes de MLC<sub>20</sub> et une isoforme de MLC<sub>23</sub>. Les têtes globulaires N-terminales de la myosine sont par ailleurs associées à deux chaînes légères qui sont essentielles aux fonctions motrices de la myosine.

## I.2. Régulation de la contraction des CMLs

C'est la phosphorylation des chaînes légères de la myosine  $MLC_{20}$  qui conditionne la contraction des CMLs. Cette phosphorylation est sous la dépendance de deux protéines : la kinase des chaînes légères de myosine, MLCK, et la phosphatase des chaînes légères de myosine, MLCP. La MLCK, est activée lors d'une élévation de la concentration de  $Ca^{2+}$  et phosphoryle la Ser19 de la  $MLC_{20}$ . Inversement, la MLCP, permet la déphosphorylation de la  $MLC_{20}$ . La régulation de la MLCP s'effectue elle-même par la phosphorylation de sa sous-unité MYPT (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 1995). Ces trois enzymes sont donc régulées par deux grandes voies au sein des CMLs : la voie calcium-dépendante, et la voie de sensibilisation au calcium (Figure2).

### - La voie calcique :

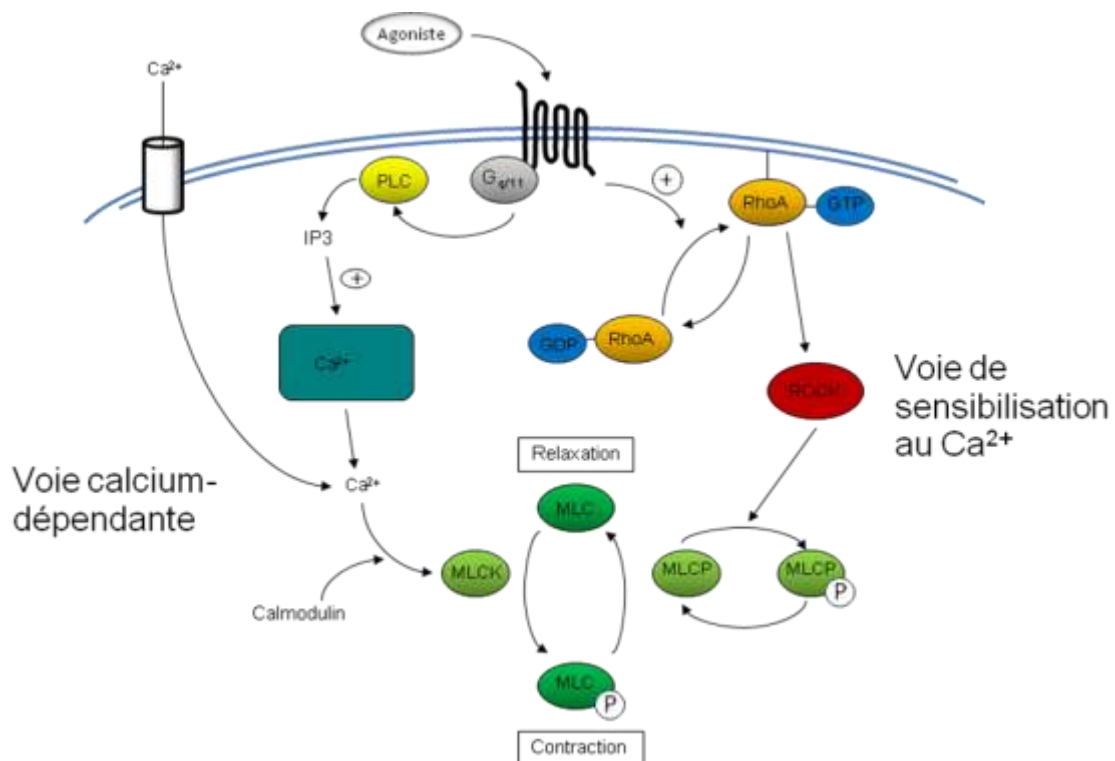
Une forte élévation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (jusqu'à  $10^{-2}M$  de variation) entraîne la contraction des CMLs. Ces variations de calcium peuvent être liées à une entrée du calcium extracellulaire, et/ou à une mobilisation des réserves intracellulaires de  $Ca^{2+}$  (Cavalli *et al.*, 2002 ; Oishi *et al.*, 2002). L'entrée du calcium depuis l'extérieur peut se faire par des canaux calciques en réponse à une dépolarisation membranaire. Cette entrée de calcium par les canaux voltage-dépendants joue un rôle majeur dans la contraction des CMLs. La mobilisation du calcium intracellulaire implique pour sa part le réticulum sarcoplasmique et dépend du couplage à un récepteur à 7 segments transmembranaires. La fixation d'un agoniste tel que les catécholamines ou l'Ang II à leur récepteur permet son activation, et, par l'intermédiaire d'une protéine G de type Gq, la stimulation de la phospholipase C (PLC). La PLC clive alors le phosphatidylinositol bisphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate ( $IP_3$ ) qui diffuse ensuite dans le cytoplasme. En se fixant à ses récepteurs au niveau du réticulum sarcoplasmique,  $IP_3$  permet la libération du calcium dans la cellule (Savineau & Marthan, 2000). C'est cette augmentation du calcium qui permet la formation du complexe  $Ca^{2+}$ -Calmoduline, l'activation de la MLCK et la phosphorylation de la  $MLC_{20}$ .

### - La voie de sensibilisation au calcium :

Cependant, pour assurer correctement leur fonction, les CMLs doivent développer des contractions maintenues. Or des élévations maintenues de  $Ca^{2+}$  intracellulaire sont toxiques pour la cellule. Les phases de maintien de la contraction impliquent donc l'existence d'une autre voie de signalisation : c'est la voie de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile. Cette voie de signalisation permet le maintien de la contraction maximale à une concentration constante et faible de  $Ca^{2+}$ . Ce maintien de la contraction est obtenu par une inhibition de la MLCP et fait intervenir, comme pour la voie calcium-dépendante, un récepteur membranaire à 7 domaines transmembranaires qui, couplé à différentes protéines G, induit l'activation de la



petite protéine G RhoA et d'une de ses cibles, les kinases Rocks. A leur tour, les Rocks phosphorylent la sous-unité MYPT de la MLCP et l'inactivent. Ainsi la phosphorylation de la  $MLC_{20}$  augmente et la contraction sera maintenue.



**Figure2 : Mécanisme de contraction des CMLs**

La signalisation calcique entraîne l'activation de la MLCK. La mobilisation du calcium ne pouvant pas être permanente, la voie de sensibilisation de l'appareil contractile permet d'inhiber la MLCP et ainsi de maintenir la contraction à une concentration faible de  $Ca^{2+}$ .

### I.3. La petite protéine G RhoA

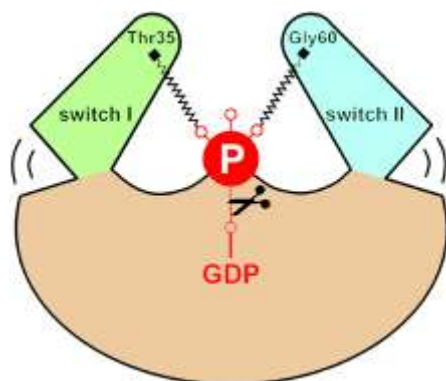
La famille des GTPases Rho (Ras Homolog) fait partie d'un ensemble appelé la superfamille Ras des petites protéines G. Le premier membre de la famille Rho à avoir été identifié est RhoA. C'est l'équipe de Richard Axel qui l'isole à partir d'une banque d'ADNc d'Aplysie en 1985 (Madaule & Axel, 1985). Sur la base de leur homologie de séquences, les membres de la famille Rho sont regroupés en 6 sous familles : Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB et RhoT/Miro. L'ensemble des protéines G monomériques de la famille Rho intervient dans le contrôle de processus fondamentaux dont l'organisation du cytosquelette ou l'expression de gènes. Elles ont donc motivé de nombreuses études permettant de mieux comprendre leur régulation et d'identifier leurs partenaires et leurs fonctions. Parmi les protéines de cette famille, les mieux caractérisées sont aujourd'hui RhoA, Rac, et Cdc42. RhoA présente une forte similarité avec RhoB et RhoC puisque l'homologie de séquence est

de 83%, mais on retrouve en revanche 45% d'homologie avec Rac et Cdc42. Ces différences de séquence déterminent des interactions spécifiques avec les partenaires, effecteurs et régulateurs, à l'origine de voies de signalisation et de fonctions spécifiques (Maesaki *et al.*, 1999).

#### a) Structure de RhoA

Comme les autres protéines G monomériques, RhoA possède une activité GTPasique intrinsèque. En véritable interrupteur moléculaire, elle oscille ainsi entre 2 conformations selon le nucléotide auquel elle est rattachée : l'une active liée au nucléotide GTP et l'autre inactive liée au GDP. Plusieurs travaux de cristallographie ainsi que l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire ont permis de déterminer les structures secondaire et tertiaire de cette protéine d'environ 20 kDa associée au GDP (Wei *et al.*, 1997), au GTP (Ihara *et al.*, 1998) et en complexe avec ses effecteurs (Maesaki *et al.*, 1999). La structure secondaire de RhoA est constituée de cinq hélices alpha (A1 à A5), de trois hélices  $3_{10}$  (H1 à H3), de six brins (B1 à B6) formant un feuillet beta et de dix boucles polypeptidiques dont cinq sont impliquées dans l'interaction avec le nucléotide (G1 à G5). Cette structure caractérise le domaine canonique G. En C-terminal, RhoA possède un motif CAAX, de séquence CLVL, qui sert de substrat à des géranylgeranyltransférase. La prénylation de RhoA en position 190 permet son ancrage à la membrane.

Le passage, ou switch, de la conformation inactive à la conformation active est déterminé par le changement de nucléotide. GDP et GTP interagissent de manière différente avec le domaine G : on a en effet présence d'interactions supplémentaires lors de la liaison au GTP (Vetter & Wittinghofer, 2001). Ces interactions consistent en deux ponts hydrogènes formés par deux résidus fortement conservés au sein des protéines G, la thréonine 35 (située au niveau de la région switch I) et la glycine 60 (switch II), avec l'oxygène du phosphate  $\gamma$  du GTP. La thréonine est également impliquée dans la liaison du  $Mg^{2+}$  via ses chaînes latérales. Le changement de conformation intervient ensuite après hydrolyse du phosphate  $\gamma$  du GTP qui permet le retour des switch I et II à la conformation liant le GDP (Figure3).



**Figure3 : Schéma du mécanisme de switch.**

La libération du phosphate  $\gamma$  après hydrolyse du GTP permet aux régions switch de changer de conformation. D'après Vetter *et al.*, 2001.

## b) Régulation de l'activité de RhoA

RhoA, sous sa forme inactive, se retrouve séquestrée dans le cytosol par une protéine nommée Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor (GDI). Le passage à la forme activée est rendu possible par l'intervention de GDI Dissociation Factors (GDFs) d'une part, qui déstabilisent le complexe Rho-GDI, et de facteurs d'échanges d'autre part, les Guanosine nucleotide Exchange Factors (GEFs), qui catalysent l'éjection du GDP et son remplacement par le GTP. C'est sous cette forme, et une fois qu'elle est ancrée à la membrane, que RhoA pourra interagir avec ses effecteurs. Inversement, le passage de la forme activée à la forme inactivée est permis par l'intervention de GTPase Activating Proteins (GAPs) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP (Figure4).

L'activité des GEFs, des GAPs, et des GDIs est elle-même modulée par une grande variété de régulateurs. Par exemple, contrairement aux autres GEFs contenant un domaine RGS, la GEF Arhgef1 est activée après phosphorylation par Jak2 en réponse à l'Ang II (Guilluy *et al.*, 2010). De même, l'état de phosphorylation de la GAP p190A conditionne l'activation de RhoA. Après la stimulation des récepteurs de type 1 à l'Ang II (AT1R), la phosphatase SHP2 déphosphoryle la GAP p190A, ce qui l'inhibe et active la voie RhoA-Rock (Bregon *et al.*, 2009). Enfin, DerMardirossian et Bokoch décrivent l'existence de régulateurs capables de diminuer la liaison de Rho au GDI. La tyrosine kinase Etk et le récepteur de la neurotrophine p75 (p75<sup>NTR</sup>) permettent ainsi la libération de RhoA de son complexe avec RhoGDI. L'état de phosphorylation de RhoGDI serait également important pour la stabilité de sa liaison aux différentes GTPases (DerMardirossian & Bokoch, 2005).



**Figure4** : Cycle d'activation de la protéine RhoA.

Le passage de la forme inactive à la forme active nécessite l'intervention d'un facteur de dissociation du GDI (GDF) et d'un facteur d'échange guanylique (GEF).

En plus de sa régulation par les GEFs/GAPs, un nouveau mode de régulation de RhoA a été mis en évidence : sa phosphorylation. La phosphorylation du résidu sérine en position 188 augmente l'affinité de la protéine pour le GDI, permettant son extraction de la membrane et sa séquestration dans le cytosol. L'affinité de RhoA pour son principal effecteur Rock en est également

significativement diminuée. En conséquence, la voie RhoA-Rock est ainsi inhibée (Sauzeau *et al.*, 2000). Cette séquestration permet par ailleurs de protéger RhoA, et particulièrement sa forme active, de la dégradation par le protéasome en inhibant son ubiquitinylation (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005), et d'augmenter son expression (Sauzeau *et al.*, 2003). Plusieurs kinases capables de médier cette phosphorylation ont été identifiées à ce jour. La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) est ainsi capable de phosphoryler RhoA sur son résidu sérine en position 188. La PKG est activée par le monoxyde d'azote (Nitric Oxide ou NO). C'est en effet ce dernier, en provenance des cellules endothéliales de l'intima, qui, par activation de la guanylate cyclase (GC) des CMLs va augmenter le taux de GMPc et activer la PKG. La protéine kinase A (PKA) est également capable de phosphoryler la protéine RhoA en S188. Le mécanisme d'activation de la protéine kinase A passe toutefois par l'AMP cyclique (Lang *et al.*, 1996). Enfin, Ste-20-related kinase (SLK), une sérine-thréonine kinase, a été identifiée comme une autre protéine capable d'induire la phosphorylation de RhoA, toujours sur sa sérine en position 188. C'est la stimulation des récepteurs à l'Ang II de type 2 (AT<sub>2</sub>R) au niveau des CMLs qui, via l'activation de la SHP-1/caseine kinase II (CK2), permettra la phosphorylation de SLK et son activation. Ceci explique l'effet vasodilatateur lié à l'Ang II (Guilluy *et al.*, 2008).

### c) Effecteurs de RhoA

Les petites protéines Rho sont impliquées dans un grand nombre de fonctions cellulaires. Pour assurer l'ensemble de ces fonctions spécifiques, les protéines Rho possèdent une quinzaine d'effecteurs cellulaires. Aujourd'hui, soixante dix effecteurs des protéines Rho, Rac et Cdc42 ont été identifiés (Bustelo *et al.*, 2007).

Rho-kinase a été le premier effecteur de RhoA identifié et caractérisé. Il existe deux isoformes de cette protéine : Rock I nommée également Rok $\beta$  ou p160Rock et Rock II (Rok  $\alpha$  ou Rho-kinase) situées respectivement sur les chromosomes 18 (18q11.1) et 2 (2p24). Ces sérine/thréonine kinases d'environ 160 kDa ont notamment été retrouvées au niveau des CMLVs et du cœur (Loirand *et al.*, 2006a). Le domaine kinase des protéines Rocks est situé dans la région N-terminale, tandis qu'on retrouve à l'extrémité C-terminale le domaine de liaison à RhoA (Rho-binding domain ou RBD) et un domaine PH (pleckstrin-homology) avec un domaine riche en cystéine (cystein rich domain ou CRD) (Figure5). On note que les formes tronquées des Rocks dans lesquelles il manque la portion C-terminale (domaines RBD et PH) sont constitutivement actives, alors que la surexpression de la portion C-terminale agit comme un dominant négatif (Amano *et al.*, 1999). Il a ainsi été suggéré que la région C-terminale des protéines Rocks soit une région régulatrice, impliquée dans l'auto-inhibition probablement par interaction avec le domaine kinase (Amano *et al.*, 2000). Les Rocks peuvent également être activées par certains lipides tels que l'acide arachidonique ou la sphingosine phosphorylcholine de façon indépendante de RhoA (Feng *et al.*, 1999 ; Shirao *et al.*, 2002), ou par

clivage de la région auto-inhibitrice C-terminale. Rock I est ainsi clivée par les caspases-3 lors de l'apoptose (Sebbagh *et al.*, 2001) et Rock II est clivée par les granzymes B (Sebbagh *et al.*, 2005). Par ailleurs, RhoE peut se lier à la région N-terminale de Rock I et empêcher ainsi la fixation activatrice de RhoA (Riento *et al.*, 2003).



**Figure 5 : Exemple d'activation de la protéine Rock.**

Le passage de la forme inactive à la forme active nécessite la liaison de RhoA-GTP au niveau du domaine RBD. Adapté d'après Loirand *et al.*, 2006a.

Les protéines Rocks phosphorylent et modifient l'activité de nombreuses protéines cibles dans différents types cellulaires. Parmi celle-ci on retrouve MYPT-1, CPI-17, la MLC20 et la Calponine, qui jouent toutes un rôle important dans la contraction des CMLs (Loirand *et al.*, 2006a). ERM et la LIM kinase font également partie des substrats des protéines Rocks. Ils sont impliqués respectivement dans la réorganisation du cytosquelette (Matsui *et al.*, 1998), et la régulation des fibres de stress, des filaments d'actine reliés entre eux par la myosine, ainsi que la migration et l'adhésion cellulaire (Maekawa *et al.*, 1999). L'action de Rho-kinase sur ses différentes cibles permet ainsi de contrôler de nombreuses fonctions cellulaires telles que la formation des fibres de stress d'actine, la contraction des CMLs, l'adhésion et la migration cellulaire ou encore l'apoptose.

Il existe d'autres effecteurs de RhoA. Les isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  de PKN interagissent par exemple avec cette kinase. Les différentes PKNs sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires. Les PKNs  $\alpha$  et  $\gamma$  possèdent un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine et l'adhésion cellulaire. La PKN $\alpha$  pourrait également avoir un rôle dans la contraction des CMLs en phosphorylant la CPI-17 (Hamaguchi *et al.*, 2000), et dans le transport de vésicules dans le reticulum endoplasmique (Kawamata *et al.*, 1998). Les PKNs semblent également participer au contrôle du cycle cellulaire en inactivant par phosphorylation Cdc25 une phosphatase impliquée dans le contrôle et la déphosphorylation de Cdc2. L'inactivation de Cdc25 provoque en effet un retard de l'entrée en mitose (Su *et al.*, 2007). En utilisant une banque d'ADNc d'embryon de souris, Reid *et al.* ont identifié un autre effecteur de RhoA : la rhotekine (Reid *et al.*, 1996). Cette protéine de 61 kDa est exprimée surtout dans la prostate, et inhibe l'activité GTPasique des petites protéines G ainsi que celle des

GAPs. La citron-kinase (CRIK), un autre des effecteurs de RhoA, a une forte homologie de structure avec les Rho-kinases. Elle peut en réalité se lier à RhoA mais également à RhoB, RhoC et Rac1. CRIK se localise principalement au niveau des anneaux contractiles qui permettent la division cellulaire (Madaule *et al.*, 1998). Elle aurait un rôle majeur dans ce processus. mDia quant à elle est l'homologue chez le mammifère de *Drosophila diaphanous*. Elle fait partie d'une famille de protéines qui contrôlent la morphogénèse, la différenciation embryonnaire, la cytokinèse et la polarité cellulaire. L'activation de mDia suite à la fixation d'une petite G (Rho, Rac et Cdc42) lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines telles que Scr, VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) et Bnr 1p pour réorganiser le cytosquelette d'actine, former des filopodes ou activer la transcription (Gasteier *et al.*, 2003). La phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (P5K) est une protéine kinase qui peut se lier à la gelsoline ou à la profiline pour induire la polymérisation de l'actine (Stossel, 1993). *In vitro* la P5K peut fixer RhoA, Rac et Cdc42 avec une meilleure affinité pour Rac (Tolias *et al.*, 1995). Toutefois, Shibasaki *et al.* montrent que RhoA activé active l'isoforme  $\alpha$  de la P5K qui entraîne la réorganisation du cytosquelette d'actine (Shibasaki *et al.*, 1997). Enfin, la raphiline, la kinectine, la diacylglycérol kinase (DAG kinase), et les phospholipases D (PLDs) sont également d'autres effecteurs des Rho.

#### d) Fonctions vasculaires de RhoA

Au niveau des vaisseaux, RhoA a de nombreux effets, tant sur les cellules endothéliales que sur les CMLs. Elle joue ainsi sur la perméabilité et la migration des cellules endothéliales. Elle module en effet la perméabilité cellulaire en contrôlant, avec son effecteur Rock, l'organisation du cytosquelette d'actine et la contraction cellulaire, et elle est responsable de la migration cellulaire induite par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), la sphingosine-1-phosphate et le forces de cisaillement (Rolfe *et al.*, 2005). Les protéines Rock, en régulant à la fois la perméabilité et la migration des cellules endothéliales, jouent un rôle important dans l'initiation de l'angiogénèse (Loirand *et al.*, 2006a). RhoA et son effecteur Rock régulent également la voie du NO au sein des cellules endothéliales. L'activité de la voie RhoA-Rock diminue par exemple l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) en réduisant la stabilité de son ARNm (Laufs & Liao, 1998).

RhoA intervient également dans la formation de fibres de stress, mais également dans la différenciation, la prolifération, la migration et la contraction des CMLs. Il a ainsi été montré que RhoA, via son effecteur Rock, contrôle la différenciation des CMLs en régulant la transcription de gènes dépendants du facteur de réponse au sérum (SRF). De nombreux travaux ont également mis en évidence un contrôle positif de RhoA sur la prolifération cellulaire. Toutefois les mécanismes responsables de cet effet ne sont pas complètement déterminés et semblent impliquer plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire. RhoA pourrait ainsi agir par la régulation de l'expression de p27 ou de p21, deux inhibiteurs des CDKs (Cyclin Dependent Kinase) (Hu *et al.*, 1999 ; Laufs *et al.*, 1999 ; Coleman *et al.*, 2006). D'autre part, la voie Rho/PKN exerce un contrôle négatif sur le cycle

cellulaire (Su *et al.*, 2007) et RhoA-Rock, par l'intermédiaire des MAPKs, est impliqué dans l'hypertrophie des CMLs induite par l'Ang II (Yamakawa *et al.*, 2000). Comme décrit précédemment, RhoA, enfin, régule la contraction des CMLs par son rôle au sein de la voie de sensibilisation au calcium de l'appareil contractile, et les protéines Rocks jouent un rôle crucial dans la régulation de cette voie (Loirand *et al.*, 2006a).

Les fonctions vasculaires de RhoA impliquent deux types de réponse : aiguë et chronique. De manière aiguë, RhoA joue sur l'état de vasoconstriction/vasodilatation des vaisseaux en réponse à divers stimuli, alors que de manière chronique, la protéine serait impliquée dans les processus de remodelage des vaisseaux. Ainsi, la suractivation de la voie RhoA-Rock a été associée à des pathologies telles l'hypertension, la resténose, l'athérosclérose, ou encore l'hypertension artérielle pulmonaire. En effet, Seko *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la quantité de RhoA-GTP dans les artères de différents modèles animaux d'hypertension (Seko *et al.*, 2003). Guilluy *et al.* montrent également que la régulation de l'activité de RhoA par Arhgef1, un de ses GEF, est un événement crucial dans le développement de l'hypertension induite par l'Ang II (Guilluy *et al.*, 2010). D'autres études réalisées chez le porc montrent que l'inhibition à long terme de Rock diminue la formation de la néointima observée après l'implantation de stent, et réduit significativement l'athérosclérose coronaire (Loirand *et al.*, 2006b). L'inhibition de Rock prévient également le développement du remodelage vasculaire et l'élévation de pression artérielle pulmonaire dans des modèles hypoxiques (Loirand *et al.*, 2006b). La régulation de l'activité de cette protéine est donc un phénomène essentiel.

Un contrôle fin de l'état d'activation de RhoA étant nécessaire à la régulation des fonctions vasculaires, l'état phosphorylé ou non de la protéine a un impact potentiellement important en physiologie et pathologie vasculaires. Les pathologies vasculaires sont classiquement associées à une dysfonction endothéliale, et la suractivation de RhoA observée pourrait être liée à la dérégulation du système NO/PKG et à un défaut de phosphorylation de RhoA. Hormis son effet sur la régulation de la réactivité vasculaire, l'impact de la phosphorylation de la protéine a été peu étudié jusqu'à présent. De façon intéressante, une étude montre toutefois que l'expression de RhoA phosphorésistant dans les cellules musculaires lisses de souris transgéniques induit une augmentation de taille de la paroi de l'artère coronaire ainsi qu'une fibrose périvasculaire (Loirand *et al.*, 2006b). Rolli-Derkinderen *et al.* ont également montré que la phosphorylation de RhoA stimule la migration des CMLs après libération de Rac1 du complexe qu'il formait avec GDI (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2010). L'étude plus précise de la régulation de l'activité de RhoA par phosphorylation, et de ses conséquences, pourrait de ce fait avoir un intérêt particulier en physiopathologie vasculaire.

## II. L'AMPK, une kinase vasoprotectrice ?

### II.1. Structure de l'AMPK

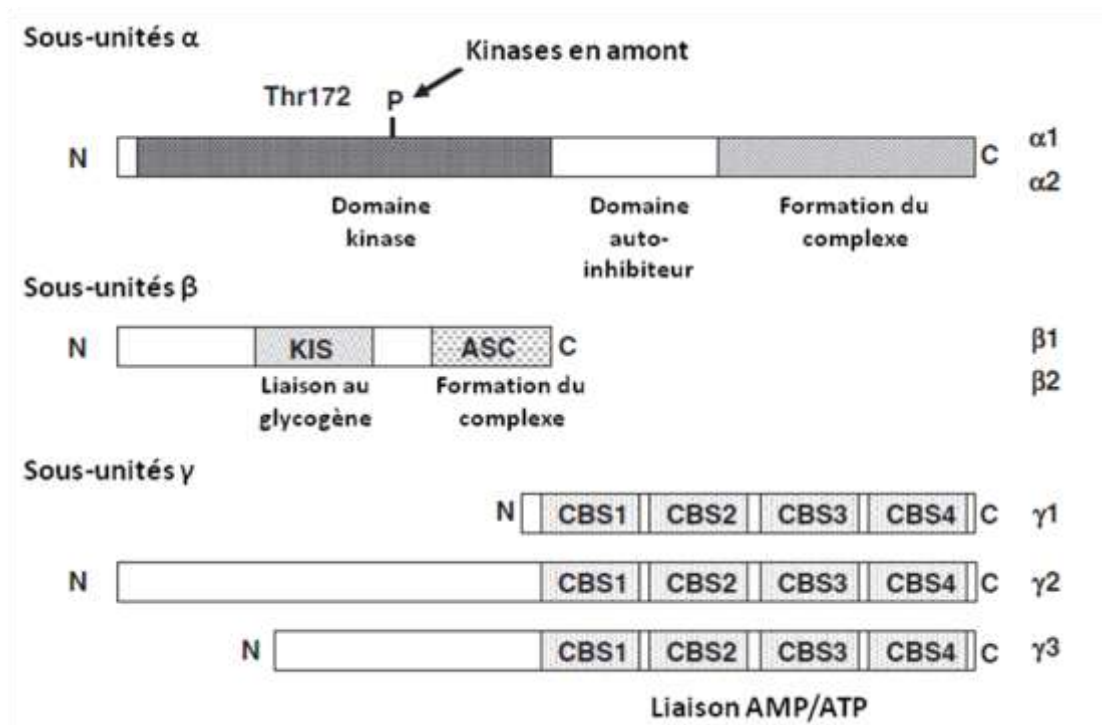
L'Adénosine 5-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire. Il s'agit d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Chez les mammifères, on retrouve deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  et trois isoformes de la sous-unité  $\gamma$ . Chaque sous-unité est codée par de nombreux gènes, et toutes les combinaisons d'isoformes semblent capables de former des complexes, ce qui donne 12 combinaisons hétérotrimériques possibles (Hardie, 2004 ; Hardie *et al.*, 2006).

Chez l'homme, les isoformes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont constituées respectivement de 550 et 552 acides aminés, et le domaine sérine/thréonine kinase se situe au niveau de la partie N-terminale (Figure 6). Ce domaine contient le résidu thréonine, dont la phosphorylation est nécessaire à l'activité, et situé dans la boucle d'activation (Hardie *et al.*, 2006 ; Nagata & Hirata, 2010). La sous-unité  $\alpha$  possède également un domaine auto-inhibiteur qui inhibe l'activation de la kinase (Nagata & Hirata, 2010). Enfin, la moitié C-terminale contient une région d'environ 150 acides aminés nécessaire pour la formation du complexe avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Carling, 2004 ; Hardie *et al.*, 2006). La sous-unité  $\beta$  joue le rôle de plateforme de liaison. Chez les mammifères, il semble que le domaine ASC (Association with Snf1p Complex) soit suffisant pour la formation du complexe avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ , tandis que le domaine KIS (Kinase Interacting Sequence) n'intervient pas dans l'interaction entre les sous-unités, mais correspondrait à un domaine de liaison au glycogène (Glycogen Binding Domain) (Hardie, 2004). Le rôle physiologique de ce domaine central N-isoamylase reste toutefois indéterminé. La sous-unité  $\gamma$  enfin possède des régions N-terminales variables suivies par quatre répétitions en tandem d'une séquence appelé motif CBS (cystathionine  $\beta$  synthase). Ils agissent par paire pour former deux modules appelés les domaines Bateman, qui constituent les sites de liaison à l'AMP (Hardie *et al.*, 2006). Les domaines Bateman peuvent également lier l'ATP. Cependant la liaison de l'ATP n'a aucun effet activateur sur l'AMPK, de sorte que des concentrations élevées d'ATP inhibent l'activation de l'AMPK en empêchant la liaison de l'AMP à la sous-unité  $\beta$  (Hardie *et al.*, 2006).

Il existe des mutations de la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK. 5 mutations faux-sens ont été détectées pour l'isoforme  $\gamma 2$  (R302Q, H383R, R531G, T400N et N488I), ainsi qu'une mutation entraînant l'insertion d'un résidu leucine (Carling, 2004). Bien que la mutation causant l'insertion de la leucine semble ne pas avoir d'effet sur son activité, les mutations faux-sens affecteraient l'activation de l'AMPK (Carling, 2004 ; Hardie, 2004) et pourraient potentiellement avoir un impact physiologique. Des mutations du gène codant pour l'isoforme  $\gamma 2$  ont en effet été rapportées pour des individus avec une hypertrophie cardiaque familiale. Chez la plupart de ces patients, des anomalies de conductance électrique ont également été détectées similaires à celles observées dans les cas du syndrome de



Wolff-Parkinson-White. Une accumulation de granules de glycogène a par ailleurs été retrouvée au niveau des cardiomyocytes des patients avec deux mutations différentes du gène codant pour l'isoforme  $\gamma 2$  (T400N et N488I) (Carling, 2004 ; Young *et al.*, 2005 ; Nagata & Hirata, 2010).



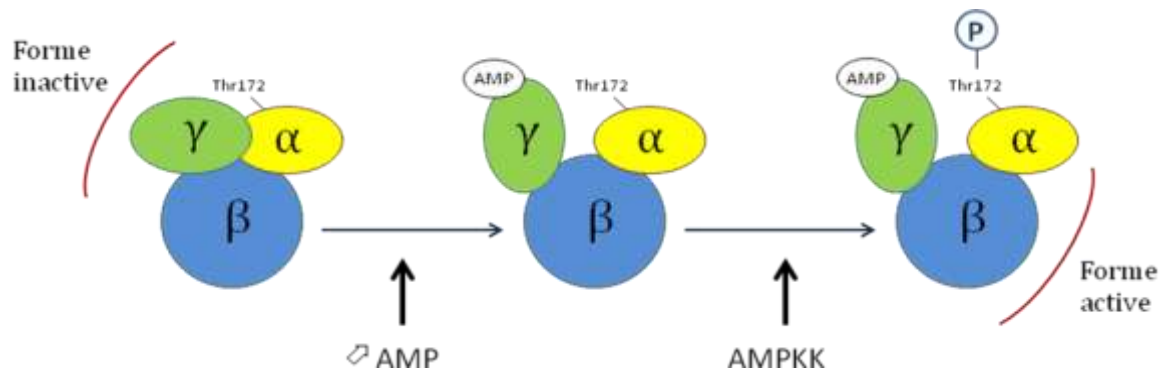
**Figure 6** : Structure de l'AMPK. Adapté d'après Nagata & Hirata, 2010.

La distribution des différentes isoformes des sous-unités de l'AMPK varie selon les tissus. L'AMPK  $\alpha 2$  est principalement située au niveau des muscles, du cerveau, du foie et du cœur qui ont des demandes importantes en énergie. En revanche, l'AMPK de type  $\alpha 1$  est relativement ubiquitaire et retrouvée dans des tissus comme le pancréas, les leucocytes, les muscles lisses et les cellules endothéliales (Li & Keaney, 2010 ; Nagata & Hirata, 2010).

## II.2. Mécanisme d'activation de l'AMPK

L'AMPK est généralement activée par des conditions où le ratio AMP/ATP augmente. Elle peut être activée par des stimuli pathologiques comme un stress oxydant, un choc osmotique, l'hypoxie ou la privation de glucose, mais également par des stimuli d'ordre physiologique comme l'exercice et la contraction musculaire, ou encore les hormones (Hardie *et al.*, 2003). L'activation du complexe AMPK par l'AMP se déroule selon trois mécanismes distincts : la liaison de l'AMP induit une activation allostérique de l'AMPK ; elle fait de l'AMPK un meilleur substrat pour les kinases en amont ; la liaison de l'AMP à l'AMPK inhibe également la déphosphorylation de Thr172 par les

protéines phosphatases (Hardie, 2004 ; Hardie *et al.*, 2006). Lorsque la thréonine 172 du domaine kinase est phosphorylée, l'inhibition du domaine auto-inhibiteur est levée, et l'activité kinase est multipliée par 12 (Nagata & Hirata, 2010) (Figure7).



**Figure7 : Mécanisme d'activation de l'AMPK.**

La fixation de l'AMP sur la sous-unité  $\beta$  de l'AMPK permet la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  et l'activation de la protéine.

Deux autres résidus pouvant être phosphorylés ont été identifiés : Thr258, et Ser485 pour l'AMPK de type  $\alpha 1$  et 491 pour le type  $\alpha 2$ . La phosphorylation de Thr172 semble être essentielle pour l'activité de l'AMPK puisque le remplacement de Thr172 par une Alanine abolit complètement l'activité de la kinase. En revanche, la phosphorylation des deux autres sites n'induit pas d'activation de l'AMPK. La phosphorylation de l'AMPK au niveau d'autres sites pourrait même inhiber la phosphorylation de Thr172 (Carling, 2004).

### II.3. Régulation de l'activation de l'AMPK

Trois kinases ont été identifiées comme capables de phosphoryler Thr172 et d'activer l'AMPK : il s'agit de LKB1, CaMKK (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase kinase)  $\alpha$  et CaMKK  $\beta$  (Hardie *et al.*, 2006). Les trois unités du complexe LKB1, STRAD (Ste20-related adaptator) et MO25 (mouse protein 25) sont indispensables à sa complète activité (Hardie, 2004) et la liaison de l'AMP à l'AMPK en fait un meilleur substrat pour la kinase. En revanche, l'augmentation en AMP ne stimule pas la phosphorylation de Thr172 par les CaMKKs, qui serait déclenchée plutôt par une augmentation de Ca<sup>2+</sup> (Hardie *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2009 ; Nagata & Hirata, 2010). De nombreux autres stimuli, parmi lesquels on retrouve notamment des hormones ou des cytokines, sont capables d'induire l'activation de la protéine de façon dépendante ou non du ratio AMP/ATP. C'est le cas de la leptine dans les muscles squelettiques et de l'adiponectine dans le foie (Young *et al.*,

2005 ; Wong *et al.*, 2009 ; Li & Keaney, 2010), mais aussi, de façon intéressante, de l'estradiol (D'Eon *et al.*, 2005 ; Schulz *et al.*, 2005 ; D'Eon *et al.*, 2008).

Des concentrations élevées d'insuline ou la surexpression d'Akt inhibent en revanche la phosphorylation et l'activation de l'AMPK. Des concentrations élevées de glycogène ont également un effet inhibiteur sur l'AMPK par interaction avec la sous-unité  $\beta$  dans les muscles squelettiques (Young *et al.*, 2005).

L'activateur pharmacologique de l'AMPK le plus utilisé est le 5 aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -4-ribofuranoside (AICAR) qui est phosphorylé en ZMP dans la cellule. Bien que moins puissant, ZMP mime les effets activateurs de l'AMP sur l'AMPK, et interagit avec la sous-unité  $\gamma$  faisant de la sous-unité  $\alpha$  un meilleur substrat pour les kinases en amont. De plus, dans la plupart des cellules, il s'accumule en concentrations suffisamment élevées pour activer l'AMPK sans perturber les niveaux cellulaires d'AMP, d'ADP ou d'ATP. Toutefois, bien que l'AICAR soit toujours très utilisé expérimentalement, ce n'est pas un activateur idéal à cause de sa courte demie-vie, l'obligation de la phosphorylation et d'une efficacité variable dépendante des conditions expérimentales (Hardie *et al.*, 2003 ; Young *et al.*, 2005 ; Wong *et al.*, 2009). Enfin, on note que les médicaments de deux classes très utilisées dans le traitement du diabète de type 2 sont également capables d'activer l'AMPK, sans que l'on connaisse précisément leur mécanisme d'action : les biguanides (dont la metformine) et les thiazolidinediones, des agonistes PPAR $\gamma$  (peroxisom proliferator-activated receptor) (Hardie, 2004 ; Young *et al.*, 2005).

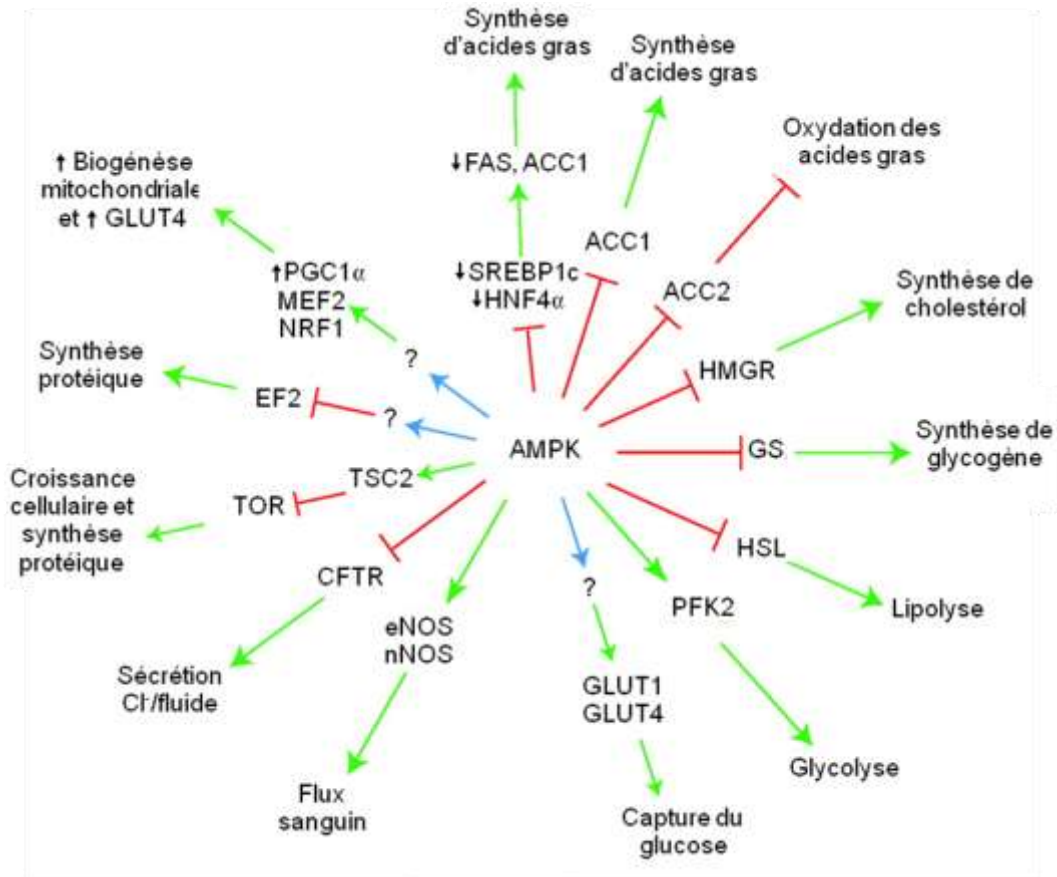
#### **II.4. Effets physiologiques de l'AMPK**

##### a) Rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

Au niveau physiologique, l'AMPK joue un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique. Une fois activée, la protéine diminue la consommation d'adénosine trisphosphate (ATP) et stimule sa production, soit à court terme en phosphorylant directement ses propres cibles, soit à plus long terme en modulant l'expression de gènes (Figure8).

Elle inhibe ainsi les voies anaboliques telles la synthèse d'acides gras ou de cholestérol en agissant respectivement sur l'acétyl-CoA carboxylase (ACC1) ou la 3-méthyl-3-glutaryl (HMG)-CoA réductase (HMGR), et la synthèse de glycogène par phosphorylation de la glycogène synthase (GS). Elle inhibe aussi la synthèse de triglycérides en phosphorylant la glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), et la lipolyse par son action sur l'hormone-sensible lipase (HSL) (Hardie *et al.*, 2006 ; Nagata & Hirata, 2010). Elle stimule d'autre part les voies cataboliques comme celle de l'oxydation des acides gras par son effet inhibiteur sur ACC2, et celle de la glycolyse en agissant sur la

phosphofructokinase-2 (PFK2) (Hardie *et al.*, 2006 ; Nagata & Hirata, 2010). Par ailleurs, la kinase module également l'activité de canaux ioniques. Elle inhibe en effet le cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), un canal chlore dépendant de la liaison de l'ATP qui régule le transport épithélial de plusieurs ions (Hardie *et al.*, 2003 ; Young *et al.*, 2005). Elle module aussi les canaux sodium voltage dépendant dans le cœur (Young *et al.*, 2005).



**Figure8** : Cibles et effets physiologiques de l'AMPK. Adapté d'après Hardie, 2004.

Les mécanismes impliqués dans la régulation des gènes par l'AMPK ne sont pas encore bien déterminés, mais l'activation de la kinase a de nombreux effets sur les facteurs de transcription et les co-activateurs. L'AMPK, augmente par exemple l'expression du co-activateur PGC1alpha, qui pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'expression de gènes mitochondriaux dans le muscle, et agit également sur NRF1 et MEF2, impliqués respectivement dans la régulation des gènes mitochondriaux ou de GLUT4 (Hardie, 2004 ; Young *et al.*, 2005 ; Hardie *et al.* ; 2006). Sous l'action de l'AMPK, on note aussi une diminution de la sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) et de l'hepatocyte nuclear factor-4α (HNF-4α) ce qui permet de réduire la synthèse d'acides gras (Hardie *et al.*, 2003 ; Hardie, 2004 ; Nagata & Hirata, 2010), ainsi qu'une phosphorylation sur Ser89 du co-activateur p300 inhibant sa capacité à interagir avec les facteurs de transcription comme PPAR

$\alpha$  et  $\gamma$  (Hardie *et al.*, 2003 ; Hardie, 2004 ; Young *et al.*, 2005). La kinase stimule finalement la calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMK IV) conduisant à une augmentation des facteurs de respiration nucléaires 1 et 2 et de l'expression d'enzymes de la chaîne respiratoire, et inhibe la synthèse *de novo* de glucose (gluconéogénèse) dans le foie par phosphorylation du co-activateur de transcription TORC2 (Hardie *et al.*, 2006). L'AMPK affecte également l'expression des protéines en agissant sur la stabilité des ARNm. Par un mécanisme non défini, l'activation de l'AMPK réduit effectivement le niveau cytoplasmique de la protéine HuR qui stabilise normalement des ARNm spécifiques dans le cytoplasme en se liant à leur région 3' non traduite (Hardie, 2004 ; Young *et al.*, 2005). L'AMPK, enfin, inhibe la synthèse protéique grâce à deux mécanismes. Elle phosphoryle et active l'eukaryotic elongation factor-2 (eEF2) kinase qui stoppe l'étape d'élongation de la traduction, et elle inhibe la voie mTor (mammalian target of rapamycin) par phosphorylation et activation du Tuberous sclerosis complex-2 (TSC-2) (Hardie, 2004 ; Nagata & Hirata, 2010).

L'AMPK joue également un rôle important dans la régulation de la prise de poids et de la balance énergétique de l'organisme entier. Dans l'hypothalamus, la ghréline et le jeûne activent l'AMPK ce qui a pour effet d'augmenter l'expression de NPY (neuropeptide orexigénique Y) et d'augmenter l'appétit. La leptine, l'insuline et la diète au contraire suppriment l'AMPK hypothalamique, réduisent l'expression de NPY et inhibent l'appétit (Hardie *et al.*, 2006 ; Nagata & Hirata, 2010).

#### b) Protection cardiovasculaire.

Au niveau cardiovasculaire, de nombreuses études ont par ailleurs permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'AMPK.

Au niveau cardiaque, l'AMPK est ainsi particulièrement sollicitée lors d'événements d'ischémie/reperfusion et dans les pathologies impliquant une hypertrophie du cœur. Dans le cœur ischémique, le métabolisme oxydatif des acides gras libres et du glucose est inhibé à cause de la diminution des apports en oxygènes, mais le transport du glucose et la production d'ATP par la glycolyse sont augmentés. L'AMPK phosphoryle et active l'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) augmentant la production de 2,6-bisphosphate, un activateur de PFK-1, et conduisant à la stimulation de la glycolyse. Elle est également un médiateur crucial du transport du glucose dans le cœur ischémique. La kinase a par ailleurs un rôle essentiel dans l'élévation de l'oxydation des acides gras libres dans le cœur post-ischémique reperfusé, c'est-à-dire une fois que les apports en oxygène et en substrats sont rétablis. Elle promeut l'oxydation des acides gras en phosphorylant ACC, diminuant la concentration de Malonyl-CoA, un inhibiteur de CPT-1 (carnitine palmitoyltransferase-1) (Young *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'insuffisance cardiaque congestive, l'hypertrophie ventriculaire gauche,

l'ischémie myocardique et les cardiopathies liées au diabète sont toutes associées à des perturbations dans l'homéostasie énergétique du cœur. Dans ces états pathologiques, l'AMPK inhibe la synthèse protéique en inactivant eEF-2 et diminuant la phosphorylation de p70<sup>RSK</sup> (p70 ribosomal protein S6 kinase) via l'inhibition de mTor. Des études ont également montré que l'activation de la kinase par la metformine ou l'AICAR induit l'inhibition de la synthèse protéique et est associée à la prévention et à la régression de l'hypertrophie cardiaque (Wong *et al.*, 2009), et que la préincubation de cardiomyocytes avec l'AICAR prévient l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'angiotensine II (Ang II) (Li & Keaney, 2010). Toutefois, d'autres études réalisées chez des souris transgéniques ont montré qu'une élévation de l'activité de l'AMPK est associée à l'accumulation de grandes quantités de glycogène, conduisant à une hypertrophie ventriculaire gauche et à des arythmies. Il reste donc à déterminer si l'activation de l'AMPK dans le cœur hypertrophié est bénéfique ou délétère (Wong *et al.*, 2009).

L'endothélium vasculaire est particulièrement sujet aux lésions dans le contexte des maladies cardiovasculaires. Une dysfonction endothéliale est par exemple observée dans le diabète et est associée à un excès de ROS (reactive oxygen species) et une activité diminuée du NO. Il a été montré que l'activation de l'AMPK par l'AICAR ou par la metformine augmente l'expression de la protéine UCP-2 (uncoupling protein-2), ce qui atténue significativement le stress oxydatif. D'autre part, l'activation *in vivo* de l'AMPK normalise la fonction endothéliale d'animaux diabétiques, notamment en préservant la GTP-cyclohydrolase, une enzyme essentielle pour la bonne activité de NO. Un autre aspect de la dysfonction endothéliale dans le diabète concerne l'augmentation des molécules d'adhésion qui contribue au recrutement de cellules inflammatoires au niveau de la paroi vasculaire. L'activation de la kinase induite par la metformine prévient en effet l'activation du NF- $\kappa$ B en réponse aux cytokines inflammatoires. En conséquence, l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1, ICAM-1, E-selectin et MCP-1, stimulée par les cytokines, est inhibée (Li & Keaney, 2010). Toujours au niveau de l'endothélium, l'AMPK augmente l'oxydation des acides gras par inhibition de l'ACC. L'activation de l'AMPK pourrait ainsi avoir un effet bénéfique sur la dysfonction endothéliale chez les diabétiques au stade insulino-résistant, caractérisés par de fortes concentrations d'acides gras dans le plasma (Young *et al.*, 2005). La dysfonction endothéliale est également associée à l'hypertension. L'activation chronique de l'AMPK *in vivo* permettrait d'atténuer l'activation par les ROS de la kinase c-Jun N-terminal et la dysfonction endothéliale en réponse à l'AngII (Li & Keaney, 2010). Enfin, dans les processus inflammatoires, l'activation de l'AMPK inhibe aussi l'adhésion des leucocytes, stimulée par TNF $\alpha$ , au niveau des cellules endothéliales de l'aorte humaine, et la migration des lymphocytes à travers l'endothélium de micro-vaisseaux de rat ou d'homme médiée par ICAM-1 (Li & Keaney, 2010). La prolifération des CMLVs impliquée dans la pathogénèse de l'athérosclérose et des lésions artérielles peut également être régulée par l'AMPK. L'activation de la kinase induit la phosphorylation de p53 et augmente les taux de la protéine p21 (Cdk inhibitor p21<sup>Cip1</sup>),

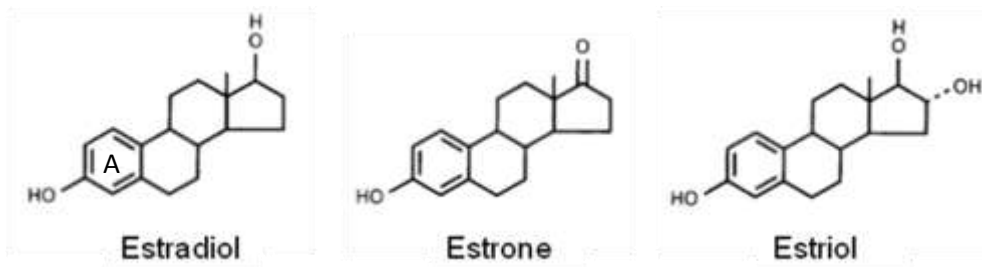
ce qui permet d'inhiber la progression du cycle cellulaire (Li & Keaney, 2010). La prolifération des CMLVs stimulée par l'AngII est aussi inhibée par activation de l'AMPK (Nagata & Hirata, 2010).

D'autre part, si la participation de l'AMPK aux phénomènes de vasorelaxation n'a pas été clairement montrée jusqu'ici, on sait cependant que l'eNOS est une de ses cibles. Au niveau des cellules endothéliales, la kinase, activée par l'estradiol, est ainsi capable de s'associer à l'eNOS et de la phosphoryler, en association avec Hsp90 (heat shock protéin 90), ce qui aboutit à une augmentation de son activité et donc de la synthèse de NO (Schulz *et al.*, 2005). Une autre étude indique que dans l'endothélium, l'adiponectine active l'AMPK et l'eNOS via le système PI3K/Akt (Nagata & Hirata, 2010). Cette phosphorylation activatrice de la NO synthase pourrait s'effectuer sur le résidu sérine en position 1177 (Wong *et al.*, 2009) ou en S633 (Fisslthaler & Fleming, 2009). L'effet bénéfique de l'activation de l'AMPK *in vivo* est de plus appuyé par le fait que la metformine, capable d'activer l'AMPK à la fois au niveau des cellules endothéliales et au niveau des CMLs, améliore les fonctions vasodilatatrices. On ignore en revanche actuellement si cet effet est lié à une modulation de l'activité de l'eNOS ou implique une autre voie de signalisation (Fisslthaler & Fleming, 2009). Par ailleurs, un travail récent de Goirand *et al.* montre que l'AMPK est capable d'induire une vasorelaxation de manière indépendante de l'endothélium et indépendante de la NO synthase (Goirand *et al.*, 2007). Cette vasorelaxation serait liée à une activation de l'AMPK $\alpha$ 1 au niveau des CMLs. De la même manière, la relaxation induite par la metformine peut être détectée pour des artères désendothélialisées ou traitées avec un inhibiteur de NO synthase (Fisslthaler & Fleming, 2009). Enfin une étude de Horman vient conforter cette hypothèse selon laquelle l'AMPK pourrait avoir une action au niveau des CMLs, en suggérant que l'AMPK inhibe la contraction en phosphorylant et inactivant la MLCK (Horman *et al.*, 2008). Les mécanismes d'action impliquant l'AMPK dans les phénomènes de relaxation vasculaire ne sont donc pas encore clairement élucidés, notamment en ce qui concerne les CMLs.

### III. Les estrogènes

#### III.1. Présentation des estrogènes

Les estrogènes correspondent à l'hormone sexuelle primaire chez la femme. On retrouve trois estrogènes endogènes naturels : l'estrone (E1), l'estradiol (E2) et l'estriol (E3), l'E2 étant l'estrogène prédominant. Ce sont des stéroïdes en C18, comportant 4 cycles A, B, C, et D, un groupement hydroxyle en C3, et enfin, soit un deuxième groupement hydroxyle, soit un groupement cétone en C17. C'est le cycle phénolique A qui est responsable de la liaison sélective de haute affinité au récepteur ER (Smiley & Khalil, 2009) (Figure9).



**Figure9** : Les estrogènes endogènes naturels chez la femme. D'après Ackerman & Carr, 2002.

Les estrogènes sont synthétisés à partir du cholestérol. Cette biosynthèse s'effectue selon deux grandes voies : la voie de la progestérone (ou  $\Delta^4$ ) passant par la transformation de la progestérone en androstènedione, et la voie de la pregnenolone (ou  $\Delta^5$ ) avec la testostérone comme intermédiaire. Chez l'humain, la voie  $\Delta^5$  est la voie majoritaire. La biosynthèse des estrogènes implique de nombreuses enzymes. On retrouve trois isoformes du cytochrome P450 : CYP11A1 (cholesterol side-chain cleavage), CYP17 (17- $\alpha$  hydroxylase) et CYP<sub>AROM</sub> pour l'aromatase ; deux dehydrogénases : la 3- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase, et la 17- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase (Ackerman & Carr, 2002) ; mais également d'autres enzymes comme la 17 kétéoreductase ou la 16- $\alpha$  hydroxylase. Cette synthèse a lieu majoritairement au niveau des cellules et tissus stéroïdogeniques comme les cellules de la granulosa chez la femme pré-ménopausée, les cellules stromales des tissus adipeux chez la femme ménopausée, et le syncytiotrophoblaste du placenta chez la femme enceinte. Mais d'autres organes et tissus produisent également localement des estrogènes parmi lesquels on retrouve la peau, l'endomètre, la muqueuse vaginale, la poitrine, le foie, le cerveau, les vaisseaux sanguins, et le cœur (Ackerman & Carr, 2002 ; Dubey *et al.*, 2004). Les enzymes nécessaires à la fabrication de l'estradiol sont en effet exprimées au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales et au niveau des fibroblastes cardiaques et des myocytes, ce qui suggère que la synthèse d'estradiol peut être importante au niveau cardiovasculaire (Dubey *et al.*, 2004). Le type d'estrogène produit au niveau de chaque tissu varie : Les ovaires sont la principale source d'estradiol circulant chez la femme pré-ménopausée. La plus grande partie de E1 ou de E3 sont formés dans le foie à partir de E2, ou dans les tissus périphériques à partir de l'androstènedione. Chez les femmes ménopausées, l'androstènedione, la testostérone et l'E1 circulants sont les précurseurs majeurs de la production d'estrogène au niveau des tissus périphériques (Smiley & Khalil, 2009).

Les hormones stéroïdes, dont les estrogènes, se lient aux protéines plasmatiques circulantes. La majorité de l'estradiol circulant et des autres estrogènes naturels sont ainsi liés fortement mais réversiblement à la SHBG (sex-hormone-binding globulin), une beta globuline produite par le foie, et avec moins d'affinité à l'albumine. L'E2 se lie de manière spécifique à la SHBG et de manière non spécifique à l'albumine. Seuls 2 à 3% des estrogènes naturels sont libres dans le sang et constituent la fraction physiologiquement active. Grâce à leur petite taille et à leur nature lipophile, ils diffusent



rapidement à travers les différents tissus, tandis que la fraction liée sert de réservoir (Ackerman & Carr, 2002 ; Smiley & Khalil, 2009).

### III.2. Métabolisme des estrogènes

La métabolisation de l'estradiol permet la formation de composés hydrophiles éliminés par les reins dans l'urine et par le foie dans les fécès (Dubey *et al.*, 2004). Le métabolisme des estrogènes débute par une oxydation (hydroxylation), dépendante du NADPH, réalisée par les membres du cytochrome P450 (CYPs) (Smiley & Khalil, 2009), une superfamille de monooxygénases qui sont impliquées dans le métabolisme de composés endogènes et exogènes (Dubey & Jackson, 2001). L'estradiol et ses métabolites hydroxylés subissent ensuite une glucuronylation par l'UDP-glucuronosyltransférase, une sulfonation par la sulfotransférase ou une O-méthylation par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT). Ce métabolisme se déroule principalement au niveau du foie où sont exprimées la majorité des enzymes du CYP (Smiley & Khalil, 2009). En effet, bien que les reins excrètent des métabolites des estrogènes dans l'urine, leur fonction consiste avant tout en la filtration de ces métabolites depuis le sang (Ackerman & Carr, 2002).

L'estradiol possède de multiples sites d'hydroxylation, et le type de métabolite hydroxylé formé dépend de la position de l'hydroxylation (C-2, C-4, C-6, C-7, C-11, C-14, C-15, C-16 et C-17). Le ratio entre les formes hydroxylées peut être altéré sous certaines conditions : chez les femmes anorexiques, on trouve par exemple plus de 2-hydroxyestradiol, tandis qu'on trouve en revanche plus de 16-hydroxyestradiol chez les femmes obèses (Ackerman & Carr, 2002). L'hydroxylation de l'estradiol en C-2 (par CYP1A1) ou en C-4 (par CYP1B1) résulte en la formation de catécholestrodiols : le 2-hydroxyestradiol (2-(OH)E<sub>2</sub>) et le 4-hydroxyestradiol (4-(OH)E<sub>2</sub>). Dans le foie, 80% de l'E<sub>2</sub> est transformé en 2-(OH)E<sub>2</sub> et 20% en 4-(OH)E<sub>2</sub> (Dubey *et al.*, 2004) et les estrogènes sous forme catéchol venant du 2-hydroxyestrogène constitueraient la forme catabolique majoritaire (Ackerman & Carr, 2002). Ces 2 composés sont rapidement méthylés par O-méthylation en méthoxyestradiols (2-méthoxyestradiol et 4-méthoxyestradiol). Cette réaction est catalysée par la COMT, une enzyme cytosolique exprimée dans la plupart des tissus dont les organes reproducteurs, le foie, et le rein, et présente sous forme active au niveau des cellules vasculaires (cellules endothéliales et CMLVs) et cardiaques (fibroblastes) (Dubey & Jackson, 2001 ; Dubey *et al.*, 2004). La méthylation donne des composés plus lipophiles (Dubey & Jackson, 2001). L'estrone peut également être hydroxylée en de multiples positions et générer de multiples métabolites hydroxylés (Dubey & Jackson, 2001). L'estradiol, l'estrone et leurs métabolites hydroxylés peuvent également subir une conjugaison ou une estérification. Les métabolites formés peuvent posséder une activité biologique mais peuvent également servir de réservoir pour la libération lente d'estradiol, d'estrone ou de leurs

métabolites hydroxylés puisque les enzymes peuvent les reconvertir en leur état d'origine (Dubey & Jackson, 2001).

On note enfin que le métabolisme de l'E2 peut varier selon le stade du cycle menstruel, l'état ménopausé ou non, et le contexte génétique. Les médicaments ou des facteurs environnementaux comme la fumée de cigarette pourraient également induire ou inhiber les enzymes qui métabolisent les estrogènes, et ainsi altérer leur clairance (Smiley & Khalil, 2009).

### III.3. Récepteurs aux estrogènes

#### a) Structure des récepteurs

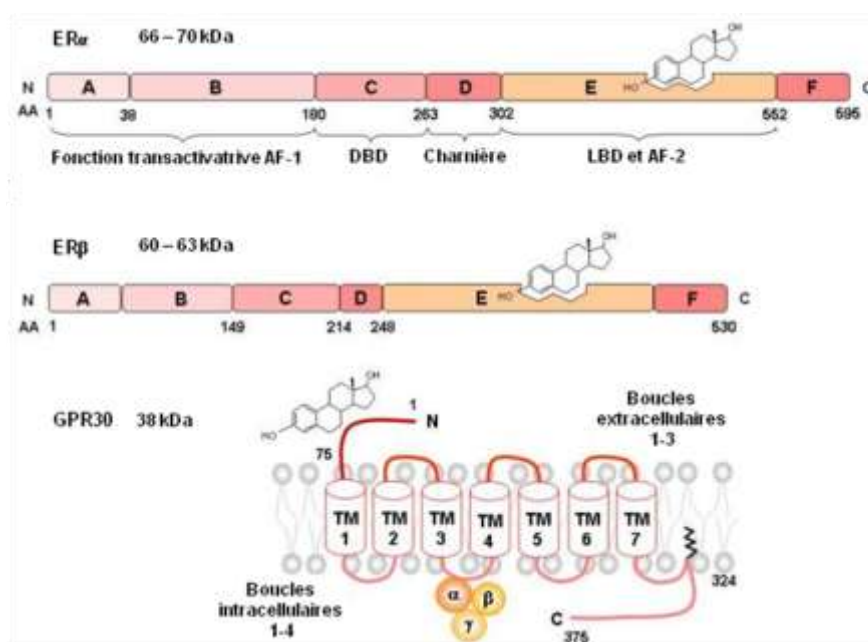
Les premiers récepteurs aux estrogènes (ERs) à avoir été décrits appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Il existe deux sous-types de ces récepteurs aux estrogènes,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui sont codés par deux gènes distincts avec des localisations chromosomiques différentes: ERS-1 est situé sur le chromosome 6q(25.1) et code pour ER $\alpha$ , alors que ERS-2 est situé sur le chromosome 14q(23-24.1) et code pour ER $\beta$ . Ces deux gènes comprennent 8 exons séparés par 7 régions introniques, et s'étendent sur environ 140 kilobases et 40 kilobases respectivement. L'ARNm sauvage non tronqué d'ER $\alpha$  code pour 595 acides aminés et celui de  $\beta$  pour 530 (Smiley & Khalil, 2009). ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont 44% d'homologie dans toute la séquence aminoacide. Ils partagent les mêmes domaines structuraux que les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires : A/B, C, D, E et F (Figure10).

- **La région A/B** est impliquée dans les interactions protéine/protéine et dans l'activation de la transcription des gènes cibles. Elle possède une fonction transactivatrice AF-1 (Activation function 1) indépendante du ligand au niveau N-terminal, dont l'activité est promoteur et cellule spécifiques. ER $\alpha$  et ER $\beta$  partagent environ 24% d'identité des acides aminés dans cette région (Carpenter & Korach, 2006 ; Smiley & Khalil, 2009).
- **Le domaine C** est le domaine de liaison de l'ADN, DBD (DNA-binding domain). Il contient quatre cystéines arrangées de manière à former deux doigts de zinc. Ce domaine est impliqué dans la liaison à l'ERE (estrogen response element) sur l'ADN cible, et intervient également dans la dimérisation du récepteur. Cette partie du récepteur est très conservée entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  puisque qu'on recense 95% d'homologie entre leurs séquences aminoacides, suggérant que les deux récepteurs reconnaissent des séquences ADN identiques et régulent donc de nombreux gènes cibles identiques.
- **Le domaine D**, ou domaine charnière, est en revanche beaucoup moins conservé entre les deux récepteurs (30% d'homologie). Il sert de charnière amovible entre le DBD et le domaine de liaison

du ligand, le LBD (Ligand-binding domain). Il favorise également l'association entre le récepteur ER et la protéine chaperonne Hsp90.

- **Le domaine E** est le domaine de liaison du ligand (LBD). Ce domaine contient une fonction transactivatrice AF-2 dépendante du ligand, lieu de liaison des co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription. Ce domaine est important pour la liaison du ligand mais intervient également dans la dimérisation du récepteur. Concernant ce domaine, on retrouve une homologie d'environ 55% des séquences aminoacides, et la structure tridimensionnelle est très similaire entre les deux récepteurs.
- Enfin, **le domaine F**, pour lequel la fonction n'est pas parfaitement déterminée pour le moment, présente moins de 20% d'homologie entre les deux récepteurs.

L'étude approfondie de ces différents domaines permet de mieux comprendre leur implication respective dans les effets médiés par les estrogènes via leurs ERs. Par exemple, selon le type cellulaire et le promoteur, les fonctions transactivatrices AF-1 et AF-2 agiraient soit de manière indépendante soit de façon synergique dans la régulation des gènes (Miller & Duckles, 2008), alors que l'activation maximale de la transcription induite par les ERs serait médiée par l'action synergique d'AF-1 et AF-2 (Smiley & Khalil, 2009). Billon-Galés *et al.* ont par ailleurs montré que bien que la fonction transactivatrice AF-1 du récepteur ER $\alpha$  soit indispensable à l'estradiol pour agir sur ses cibles au niveau des tissus reproducteurs, elle n'est pas essentielle pour médier certains de ses effets vasoprotecteurs, comme la production de NO. L'utilisation d'agents sélectifs stimulant ER $\alpha$  avec une action minimale au niveau de la région AF-1 pourrait donc procurer des effets bénéfiques au niveau vasculaire, tout en minimisant les effets sur la reproduction (Billon-Galés *et al.*, 2009).



**Figure10 : Structure primaire des récepteurs aux estrogènes.**

Adapté d'après Smiley & Khalil, 2009.

Beaucoup de composés, stéroïdiens ou non, se lient aux ERs parmi lesquels on retrouve les estrogènes naturels ou synthétiques et leur métabolites, les phytoestrogènes, les SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) et les agonistes et antagonistes spécifiques des ERs (Miller & Duckles, 2008 ; Smiley & Khalil, 2009). Ces récepteurs peuvent également être activés par des facteurs de croissance en absence d'estrogène, quand le taux de facteurs de croissance est élevé ou quand le taux d'estrogène est bas (Mendelsohn & Karas, 1999 ; Miller & Duckles, 2008). Dans de nombreux types cellulaires, les deux récepteurs s'assemblent en homodimères, mais ils peuvent aussi s'assembler entre eux et donner des hétérodimères (Mendelsohn & Karas, 1999 ; Smiley & Khalil, 2009).

Un autre récepteur liant l'estradiol avec une haute affinité a été identifié plus récemment, GPER ou GPR30. L'existence du récepteur GPR30 a été suggérée avec la mise en évidence d'une voie de signalisation médiée par les estrogènes et impliquant une protéine G, ainsi que la présence de sites de liaison aux estrogènes à la membrane (Smiley & Khalil, 2009). Le gène codant pour le récepteur GPR30 est situé sur le chromosome 7p22. GPR30 est un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G. Sa structure comprend une partie N-terminale extracellulaire, sept hélices alpha transmembranaires, 3 boucles extracellulaires impliquées dans la liaison du ligand, 3 ou 4 boucles intracellulaires impliquées dans la liaison aux sous-unités de la protéine G, et une partie C-terminale liée à la membrane grâce à l'addition d'un lipide et également impliquée dans la liaison à la protéine G (Figure10) (Smiley & Khalil, 2009).

Enfin, il existe un dernier type de récepteur aux estrogènes mis en évidence au niveau du cerveau, ER-X (Miller & Duckles, 2008 ; Xing *et al.*, 2009), mais sa structure et sa fonction semblent encore peu décrites aujourd'hui.

## b) Localisation des récepteurs

- Localisation tissulaire

Les différentes isoformes de récepteurs varieraient selon les tissus et les espèces ce qui pourrait expliquer leur diversité fonctionnelle (Miller & Duckles, 2008). ER $\alpha$  est exprimé abondamment au niveau de l'utérus, du vagin, des ovaires, des glandes mammaires et de l'hypophalamus. ER $\beta$  est fortement exprimé au sein de la prostate et des ovaires, de l'utérus, et plus faiblement au niveau des poumons, du cerveau et des os (Mendelsohn & Karas, 1999 ; Smiley & Khalil, 2009). ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont également été retrouvés au niveau des cellules endothéliales et des CMLVs (Mendelsohn & Karas, 1999 ; Smiley & Khalil, 2009) , toutefois l'expression des ERs vasculaires varie en fonction du genre, et du lit vasculaire étudié. Par exemple, les ARNm d' ER $\alpha$  et

ER $\beta$  sont retrouvés au niveau des CMLVs humaines de l'artère coronaire, de l'artère iliaque, de l'aorte et de la veine saphène et l'expression d'ER $\beta$  est plus importante chez la femme. Chez le rat, ER $\alpha$  est exprimé principalement au niveau des vaisseaux utérins tandis qu'ER $\beta$  est plus abondant au niveau des cellules endothéliales et des CMLVs de l'aorte, de la queue et des artères utérines (Smiley & Khalil, 2009). Enfin les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont retrouvés au niveau des cellules myocardiques (Mendelsohn & Karas, 1999 ; Miller & Duckles, 2008) et sont exprimés dans les tissus adipeux humains, ER $\alpha$  étant l'isoforme la plus exprimée et ER $\beta$  étant plus exprimé chez la femme que chez l'homme (Deroo & Korach, 2006).

- Localisation subcellulaire

Alors que ces récepteurs avaient initialement été observés dans le cytoplasme, le premier élément en faveur de l'existence d'un récepteur stéroïdien à la membrane aurait été décelé en 1942 avec la description d'un effet anesthésique rapide après exposition à la progestérone. Par la suite les données soutenant la thèse de l'existence de récepteurs ERs à la membrane se sont accumulées concernant de nombreux tissus. On a ainsi un effet rapide retrouvé au niveau des tissus reproducteurs comme la poitrine, l'utérus ou les ovaires, mais aussi au niveau des os, du tissu neuronal ou encore des cellules endothéliales (Moriarty *et al.*, 2006). En fait, 5 à 10% des ERs cellulaires totaux sont retrouvés à la membrane dans de nombreuses cellules, mais ER $\alpha$  et ER $\beta$  y sont retrouvés en proportions différentes selon le type cellulaire. Par exemple ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont tous les deux retrouvés à la membrane des cellules endothéliales vasculaires, sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Dans les cellules cancéreuses du sein, on retrouve en revanche principalement ER $\alpha$  à la membrane. Ces récepteurs seraient retrouvés ancrés à la membrane grâce à des protéines adaptatrices comme la protéine caveolin-1 ou Shc (Deroo & Korach, 2006) et à une modification lipidique (Moriarty *et al.*, 2006). On a d'abord identifié la sérine 522 comme nécessaire à la localisation des ERs à la membrane, puisque ce résidu promeut l'interaction avec la Caveolin-1. La cystéine 447 du domaine E des ER $\alpha$  humains est un site de palmitoylation qui promeut l'asso des ERs avec la caveolin-1. Plus tard on a déterminé que la cystéine fait partie d'un motif de palmitoylation plus large de 9 acides aminés, retrouvé chez les deux isoformes. L'abondance de la palmitoylacyltransférase ou d'autres protéines qui facilitent la palmitoylation pourrait limiter le transport des ER à la membrane et expliquer pourquoi seulement 5 à 10% des ERs sont localisés à la membrane alors que 100% des ERs ont un site de palmitoylation (Levin, 2009).

GPR30 est retrouvé au niveau du cerveau et des tissus périphériques et pourrait jouer un rôle fonctionnel au niveau des vaisseaux. Il est notamment exprimé chez l'homme au niveau de l'artère mammaire et de la veine saphène. Sa localisation cellulaire ne semble pas encore claire, elle semble varier selon le type cellulaire et le tag utilisé pour l'analyse. On pourrait ainsi le retrouver au niveau du

réticulum endoplasmique ou au niveau de la membrane plasmique. Bien que GPR30 ait été retrouvé au niveau des vaisseaux, son rôle fonctionnel reste à définir (Miller & Duckles, 2008 ; Smiley & Khalil, 2009). Dans certains types cellulaires, GPR30 pourrait collaborer avec ER $\alpha$  situé à la membrane prenant part à un large complexe de protéines à la membrane, le signalosome, permettant la transmission du signal (Levin, 2009).

### III.4. Mécanisme d'action des estrogènes

#### a) « Effets génomiques des estrogènes »

Les effets des estrogènes sur les récepteurs ERs impliquent des mécanismes transcriptionnels, aussi appelés génomiques. L'estrogène se lie à son récepteur cytosolique ER induisant une modification de conformation de ce récepteur, la libération des protéines chaperonnes, comme Hsp90, qui le maintiennent au niveau cytoplasmique sous forme inactive, et l'exposition d'une séquence de localisation nucléaire (NLS). Après homo/hétérodimérisation, le complexe ligand-récepteur peut alors être transloqué vers le noyau où il se liera à un élément de réponse aux estrogènes (ERE), une séquence nucléotidique reconnue spécifiquement par les ERs sur les régions promotrices de gènes cibles (Simoncini *et al.*, 2004). Le complexe estrogène-ER se lie aux séquences ERE de façon directe ou de façon indirecte par une interaction protéine-protéine avec les sites AP-1 (Activator protein 1) ou SP1 (specificity protein 1) sur la région promotrice des gènes cibles (Deroo & Korach, 2006 ; Safe *et al.*, 2008 ; Smiley & Khalil, 2009). Il agit en partenariat avec d'autres protéines, des co-activateurs, pour faciliter l'expression de gènes. Ces co-activateurs recrutent des protéines de l'appareil transcriptionnel général, mais ont également une activité enzymatique qui permet de faciliter la transcription, comme l'histone acétyltransférase. Il existe également des co-répresseurs qui s'associent aux récepteurs stéroïdiens et empêchent la transcription (Mendelsohn & Karas, 1999).

#### b) « Effets non génomiques des estrogènes »

Il semble toutefois clair que les estrogènes induisent des effets qui sont trop rapides (de l'ordre de secondes à minutes) pour impliquer uniquement une régulation au niveau transcriptionnel (Simoncini *et al.*, 2004 ; Hammes & Levin, 2007). Ils impliqueraient soit la liaison des estrogènes aux ERs classiques mais localisés à la membrane plasmique, soit la liaison à GPR30. Les études sur les effets des estrogènes initiés à la membrane ont mis en évidence la régulation de canaux ioniques membranaires, de récepteurs couplés à la protéine G, de tyrosines kinases et de MAPkinases, l'activation de la production d'adénylate cyclase, l'activation de la phospholipase C et l'activation de

la PI3K. On note qu'il existe parfois une fine connexion entre la voie de signalisation non génomique et les changements d'expression de gènes. Par exemple, l'activation de PI3K par ER $\alpha$  est nécessaire à l'activation de l'expression d'un certain nombre de gènes cibles des estrogènes dans les cellules endothéliales (Simoncini *et al.*, 2006). De ce fait, l'utilisation du terme « non génomique » est controversée pour décrire les mécanismes d'action non nucléaires des estrogènes, et la détermination d'une appellation convenable pour les décrire fait toujours débat (Simoncini *et al.*, 2006 ; Miller & Duckles, 2008). Cette voie de signalisation rapide semble particulièrement importante pour les tissus originellement différenciés des tissus cibles des estrogènes à cause de la basse concentration de récepteurs aux hormones stéroïdes. Parmi ces sites, on retrouve notamment le système cardiovasculaire et le système nerveux central (Simoncini *et al.*, 2006).

### III.5. Effets des estrogènes

Les stéroïdes ovariens sont des hormones avec des effets autocrines, paracrines et distants, sur une large variété de tissus (Moriarty *et al.*, 2006). Les estrogènes ont un rôle majeur dans le développement sexuel et dans la reproduction (Arnal *et al.*, 2010), et influencent la santé cardiovasculaire, l'intégrité des os, la cognition et le comportement. Ils sont donc impliqués dans le développement ou la progression de nombreuses pathologies parmi lesquelles différents types de cancers (sein, ovaire, colorectal, prostate, endomètre), l'ostéoporose, des maladies dégénératives, des maladies cardiovasculaires, la résistance à l'insuline, le lupus érythémateux, l'endométriose et l'obésité (Deroo & Korach, 2006).

Au niveau des tissus osseux par exemple, les estrogènes inhibent le remodelage osseux en réduisant la résorption médiée par les ostéoclastes et en augmentant la formation osseuse médiée par les ostéoblastes. ER $\alpha$  serait particulièrement important dans le processus de la formation osseuse alors que le rôle d'ER $\beta$  est moins défini. Des données expérimentales et cliniques supportent également l'hypothèse d'un effet protecteur des estrogènes envers les maladies neurodégénératives chez l'humain. La prévalence de la maladie de parkinson est notamment plus élevée chez l'homme que chez la femme, et des études expérimentales suggèrent que les estrogènes pourraient influencer le déclenchement et la sévérité de cette pathologie. Ils pourraient en outre inhiber la dégradation de la dopamine par des mécanismes variés dont la diminution de la neuroinflammation, la régulation du NO au niveau vasculocérébral et la protection contre les dommages liés au stress oxydatif. Les estrogènes pourraient aussi diminuer le risque ou la sévérité de la maladie d'alzheimer en réduisant le stress oxydatif et en augmentant le flux sanguin cérébral et le transport du glucose (Deroo & Korach, 2006).

#### a) Effet cardiovasculaire

Il a été montré que l'estradiol a de nombreux effets biologiques bénéfiques sur le plan cardiovasculaire. Parmi ceux-ci, on retrouve des effets bénéfiques sur l'hypertension et l'angiogénèse, une modification du profil lipidique ainsi que des systèmes de coagulation et de fibrinolyse, une activité antioxydante, et une inhibition de l'athérosclérose (Mendelsohn & Karas, 1999 ; Smiley & Khalil, 2009). L'effet des estrogènes sur les concentrations sériques de lipides viendrait notamment de leur rôle dans la régulation de l'expression hépatique des gènes d'apolipoprotéines (Mendelsohn & Karas, 1999). Les estrogènes interviendraient également sur la différenciation et la prolifération des adipocytes, la lipogénèse et la lipolyse. Les effets des estrogènes sur la lipogénèse et la lipolyse pourraient impliquer la régulation de l'expression de la LPL (lipoprotein lipase), le gène de la LPL étant une cible directe pour les estrogènes, et celle de l'HSL (hormone sensitive lipase) (Deroo & Korach, 2006). La supplémentation en estrogène chez la femme ménopausée diminue les concentrations sériques de cholestérol total et des LDL, augmente les concentrations en HDL cholestérol et en triglycérides, et diminue les concentrations sériques de Lp(a) (Mendelsohn & Karas, 1999). L'expression hépatique de gènes de plusieurs protéines de coagulation ou de fibrinolyse est également régulée par les estrogènes via les récepteurs aux estrogènes. Les concentrations plasmatiques du fibrinogène et des protéines anticoagulantes antithrombine III et protéine S sont ainsi diminuées en réponse à un traitement continu aux estrogènes. Les estrogènes diminuent aussi les concentrations plasmatiques de la protéine antifibrinolytique plasminogen-activator inhibitor type I. Des concentrations élevées d'estrogène sont associées à une augmentation globale du potentiel de fibrinolyse (Mendelsohn & Karas, 1999). Chez la femme ménopausée, l'administration à court terme et celle à long terme de  $17\beta$ -estradiol peuvent diminuer l'oxydation du LDL-cholestérol. Cet effet anti-oxydant pourrait être dû à des changements dans l'expression de gènes codant pour des enzymes qui régulent la production et la dégradation locales de superoxydes (Mendelsohn & Karas, 1999). Les effets des estrogènes sur la fonction mitochondriale pourraient notamment contribuer à la capacité des estrogènes à moduler des pathologies liées à l'âge, dont les dysfonctions endothéliales. Les estrogènes modulent les fonctions mitochondriales en augmentant la phosphorylation oxydative, tout en diminuant la production de superoxydes par la mitochondrie. Les estrogènes diminuent également les ROS par d'autres mécanismes : le traitement aux estrogènes réduit la production de radicaux libres induit par l'Ang II dans les CMLVs et diminue la production de superoxydes stimulée par NADPH au niveau des artères cérébrales de souris (Miller & Duckles, 2008).



## b) Effet sur la paroi vasculaire

Les estrogènes exercent également plusieurs effets directs sur les cellules vasculaires dont une activité anti-inflammatoire, la régulation de leur croissance et de leur migration et l'induction d'une vasodilatation (Simoncini *et al.*, 2006). Ils accélèrent notamment la croissance des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* et inhibent l'apoptose de ces mêmes cellules en culture. Les estrogènes inhibent aussi directement la migration et la prolifération des CMLVs *in vitro* (Mendelsohn & Karas, 1999). Plusieurs études ont mis en évidence des effets régulateurs au niveau de la réactivité vasculaire tant chez la femme que chez l'homme (Simoncini *et al.*, 2004 ; Miller & Duckles, 2008). Chez la femme, les fluctuations d'estrogènes circulants durant le cycle menstruel, la grossesse ou avec une supplémentation en estradiol induisent ainsi une vasodilatation et une diminution de la pression artérielle, tandis que chez l'homme, alors qu'une administration à court terme d'estrogène a peu d'effet sur la relaxation vasculaire, l'administration à long terme améliore la vasodilatation (Mendelsohn & Karas, 2005). En plus de la régulation de son expression, l'estradiol active la NOS pour augmenter rapidement la production de NO. Via ER $\alpha$ , il active la mitogen-activated protein kinase (MAPK), aboutissant à l'actibeauvation de l'eNOS (Chen *et al.*, 1999). L'estradiol active aussi la PI3K et c-Src, et, via l'activation de l'Akt, permettrait la phosphorylation de l'eNOS en S1177 et son activation (Miller & Duckles, 2008). On sait enfin que l'estradiol promeut l'association entre l'eNOS et la protéine chaperonne Hsp90, association qui est nécessaire à l'activation maximale de l'eNOS (Schulz *et al.*, 2005). L'estradiol pourrait aussi avoir des effets endothélium-indépendants. Il pourrait en effet affecter les flux d'ions à travers les canaux ioniques : l'E2 inhibe ainsi la libération de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'influx de calcium extracellulaire et active l'efflux de calcium, inhibant de ce fait la contraction vasculaire calcium-dépendante au sein des CMLs (Lee *et al.*, 2005). L'E2 inhibe également les canaux potassiques ATP-dépendants et les canaux K<sup>+</sup> activés par le calcium (Miller & Duckles, 2008). Malgré ces connaissances sur l'effet vasodilatateur des estrogènes, les mécanismes d'action non transcriptionnels de l'E2, notamment au niveau des CMLVs, restent encore largement imprécis.

**Afin de comprendre les mécanismes qui aboutissent à la suractivation de RhoA dans les pathologies vasculaires, notre équipe étudie la régulation de RhoA par les GEFs/GAPs et le GDI d'une part, et par la phosphorylation de la protéine sur sérine en position 188 d'autre part.**

- **Le 1<sup>er</sup> but de ce travail est l'identification de nouvelles kinases de RhoA et nous testerons l'hypothèse selon laquelle l'AMPK induit des effets vasodilatateurs endothélium-indépendants par phosphorylation de RhoA et inhibition de la voie RhoA-Rock. Nous**

chercherons à replacer ce mécanisme dans un contexte physiologique qu'est la vasoprotection médiée par l'estradiol (Partie « Signalisation »).

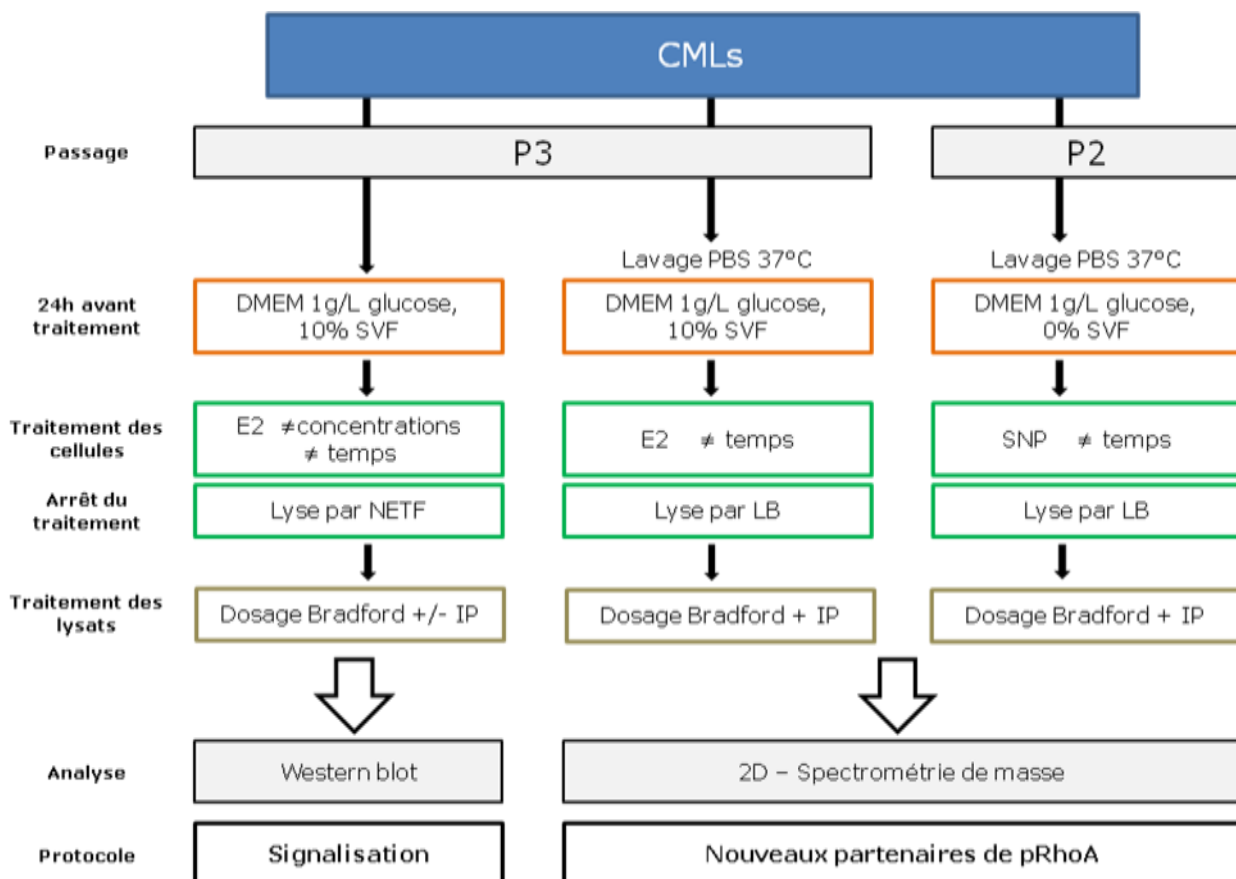
- Outre la vasodilatation, les effets physiologiques de la phosphorylation de RhoA ne sont pas connus. Dans un deuxième temps, le travail consistera donc en l'identification de nouveaux partenaires de RhoA phosphorylée (pRhoA) afin de comprendre quelles sont les autres voies régulées par la protéine phosphorylée (Partie « Nouveaux partenaires de pRhoA »).

- **MATERIEL ET METHODES**

**1. Culture cellulaire**

a. Conditions de culture

Des cellules musculaires lisses (CMLs) d'aortes de rat isolées par dissociation enzymatique comme décrit par précédemment (Guibert *et al.*, 1996) sont cultivées à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Dulbellco's Modified Eagle Medium) contenant des antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine), 4.5g/L de glucose et 10% de sérum de veau fœtal inactivé (SVF). Pour cette étude, seules les CMLs à passage 2 (P2) ou à passage 3 (P3) sont utilisées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence. Les cellules à P3 sont utilisées pour la stimulation par l'estradiol, et les cellules à P2 sont utilisées pour la stimulation par le nitroprussiate de sodium (SNP) puisque l'équipe a précédemment montré qu'elles expriment encore la PKG à ce stade (Sauzeau *et al.*, 2000) (Figure11).



**Figure11** : Schéma représentant les différentes étapes d'expérimentation associées au protocole « Signalisation » ou au protocole « Nouveaux partenaires de pRhoA ».

b. Traitements des cellules

Signalisation

24 heures avant le début du traitement, le milieu de culture est remplacé par du DMEM à 1g/L de glucose et 10% de SVF. Les cellules sont stimulées par le 17βEstradiol, à différentes concentrations et à différents temps, comme indiqué sur les figures.

Nouveaux partenaires de pRhoA

24 heures avant le début du traitement, après un rinçage au PBS à 37°C (pH 7,4), le milieu de culture est remplacé par du DMEM à 1g/L de glucose, 0% de glucose pour les P2 et 10% de sérum pour les P3, et les boîtes de culture sont replacées à 37°C. Les cellules au stade P2 ou au stade P3 sont stimulées respectivement par 100μM de SNP, ou par 10<sup>-9</sup>M de 17βEstradiol pendant 15 et 60 minutes.

c. Arrêt du traitement

Signalisation

Le milieu est retiré des boîtes de culture, et les cellules sont rincées une fois par du PBS froid. Les cellules sont ensuite lysées sur glace par une solution de 400μL de NETF complet (100mM NaCl ; 2mM EGTA ; 50mM Tris-HCl, pH 7,4 ; 50mM NaF + 1% NP40 + 1% anti-phosphatases + 1% anti-protéases + 1% Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) pour 2 millions de cellules, préparée extemporanément. Les lysats sont récupérés dans des eppendorfs, congelés à -20°C ou traités comme suit.

Nouveaux partenaires de pRhoA

Le milieu est retiré des boîtes de culture, et les cellules sont rincées une fois par du PBS à température ambiante. Les cellules sont ensuite lysées par 400μL de LB complet (20mM HEPES, pH7.5 ; 150mM NaCl ; 5mM MgCl<sub>2</sub> ; 1% Triton X-100 ; 1mM DTT ; 1mM IP) pour 2 millions de cellules, sur glace. Les lysats sont récupérés dans des eppendorfs, congelés à -20°C ou traités comme suit.

Après une centrifugation à 4°C (10000 g - 10minutes) pour éliminer les débris cellulaires et l'ADN, les protéines du surnageant seront dosées par la technique de Bradford. L'analyse des protéines s'effectuera par la technique du western blot ou grâce à la protéomique de complexes, sur des lysats totaux et/ou sur des immunoprécipitats.

#### d. Immunoprécipitation

250 à 2000µL du surnageant sont prélevés puis incubés avec l'anticorps anti-phosphoSer ou l'anticorps anti-RhoA (1/500) sur roue à 4°C pendant 1h. Nous ajoutons ensuite respectivement 20 à 100µL de protéine A ou de protéine G sépharose Fast Flow (GE) (50% slurry), préalablement rincées au NETF ou avec le LB, selon le tampon de lyse utilisé. Le mélange est placé sur roue à 4°C pendant une nuit. Enfin les échantillons sont lavés comme suit : Chaque échantillon est lavé 5 fois par du NETF ou 3 fois par du LB puis 2 fois par du Tris-HCl (10mM, pH 7,49) (centrifugation à 8000 g pendant 1'30, à 4°C) dans le cas de l'étude des nouveaux partenaires de pRhoA.

#### e. Analyse par Western blot

Les échantillons sont dénaturés par l'ajout de Laemli 5X et incubation à 95°C pendant 10 minutes. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide 7 à 12%. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec ou par transfert liquide. Le blocage s'effectue par incubation pendant 1 heure sous agitation avec une solution de TBS-Tween (50mM Tris, pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 0.1% Tween) contenant 5% de lait écrémé puis la membrane est incubée à 4°C pendant 12 heures sous agitation dans du TBS-Tween 5% de lait contenant l'anticorps primaire : anti-phosphoSer (1/250), anti-RhoA (1/ 500), anti-pMYPT (1/500) ou anti-pACC (1/500). Après rinçage au TBS, la membrane est incubée à nouveau pendant 1 heure et toujours sous agitation avec le mélange TBS - 5% lait contenant l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP). Après lavage, la détection s'effectuera grâce au kit de bioluminescence ECL Plus. Afin de vérifier la charge protéique par piste, la membrane sera être ré-hybridée avec l'anticorps anti-β-actin (1/5000) ou avec l'anticorps anti-α-tubulin (1/1000) selon le même mode opératoire.

#### f. 2D – Page

Pour la 1<sup>ère</sup> dimension, les protéines sont séparées en utilisant des strips 7cm (Immobiline Drystrip pH 3-10 – GE Healthcare) réhydratés durant 16h à 20°C avec 150µL de tampon de réhydratation (UTC ; 0.5% IPGBuffer ; 1.2% Destreak ; 0.002% bleu de bromophénol). Les échantillons sont dénaturés avec 100µL d'UTC-DTT (7M Urée ; 2M Thiourée ; 6% CHAPS ; 65mM DTT) pendant 4h sur glace puis sont soumis à l'isoélectrofocalisation dans l'Etan IPGphore II (GE Healthcare) en utilisant les gradients de voltage suivant : 50V pendant 5h, 150V pendant 3h, 300V pendant 2h, 750V pendant 2h, 1500V pendant 1h45, 3000V pendant 1h45 et 5000V pendant 1h30 puis un voltage constant de 5000V pendant 30minutes. Les strips sont ensuite rééquilibrés 15 minutes dans un tampon d'équilibration (50mM tris-HCl pH8.8 ; 6M Urée ; 30% Glycérol ; 2% SDS (w/v) + traces de bleu de bromophénol) contenant 1% DTT, suivi de 15 minutes dans le tampon d'équilibration contenant 2.5% iodoacétamide. Pour la 2<sup>ème</sup> dimension, la séparation s'effectue par électrophorèse sur

gel d'acrylamide 10% sous une tension de 100V pendant 4h. Les gels sont ensuite colorés au bleu de coomassie colloïdal (Coomassie Brilliant Blue G-250 - Pierce) ou au nitrate d'argent (Pierce Silver Stain Kit – ThermoScientific) et les images obtenues par ImageQuant-RT ECL Capture.

g. Identification des protéines par spectrométrie de masse

L'identification des protéines est effectuée par spectrométrie de masse par la plate-forme BIBS (Biopolymères Biologie Structurale) à l'INRA de Nantes. Les protéines sélectionnées sont excisées des gels et les spots sont digérés par la trypsine (Sequencing grade, Promega). Après lavage, les protéines sont réduites par le DTT et alkylées par l'iodoacétamide, puis les fragments de gels sont déshydratés et incubés pendant trois heures à 37°C avec une solution contenant de la trypsine (12.5ng/μL trypsine dans 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). L'analyse MALDI-TOF est réalisée en déposant sur une cible en inox le mélange de 0.8μL de digestat avec 0.8μL de la préparation matrice (1g/L acide α-cyano-4-hydroxycinnamique ; 50% [v/v] acétonitrile ; 0.1% [w/v] acide trifluoroacétique). Les données de spectrométrie de masse sont acquises sur un instrument de type MALDI-TOF/TOF AUTOFLEX III (Bruker Daltonic) équipé d'un laser NdYAG SmartBeam 355. L'identification des protéines est faite par comparaison des profils de masse obtenus pour les peptides avec ceux prédits de façon théorique à partir des protéines de la banque de données Uniprot (release 2010\_04 contenant 11134468 séquences). La corrélation des masses est réalisée avec une tolérance de 50ppm, à l'aide du logiciel MASCOT 2.2 (Matrix Science).

h. Drogues et réactifs

Le 17βEstradiol (E8875) resuspendu dans du DMSO, le SNP (S0501) resuspendu dans l'eau, le KCl (60130), la phényléphrine (P6126), et le carbachol (C4382) viennent de Sigma-Aldrich. L'AICAR (A611700) vient de Toronto Rresearch Chemicals. L'ICI 182,780 (1047) vient de chez Tocris Bioscience. Le Composé C (171261) et l'H89 (371962) viennent de chez Calbiochem. Les anticorps anti-pMYPT (sc17556-R) et anti-RhoA (sc418) viennent de Santa Cruz Biotechnology ; les anticorps anti- β-actin (A5316) et anti- α-tubulin (T9026) de Sigma-Aldrich ; l'anticorps anti-phosphoSer (61-8100) vient de Zymed ; l'anticorps anti-pACC (3661) de Cell Signaling. Tous les autres réactifs, sauf mention contraire, viennent de Sigma-Aldrich.

## 2. Modèles animaux

Les souris femelles AMPK  $\alpha 1$   $+/+$  et AMPK  $\alpha 1$   $-/-$  utilisées pendant l'étude, âgées de 12 à 20 semaines, ont été aimablement fournies par B. Viollet (Institut Cochin, CNRS –UMR8104, Paris, France). A ce jour, ces souris ne présentent pas de phénotype particulier en dehors d'une hypertrophie de la rate comme il a été décrit précédemment (Föller *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010).

### a. Ovariectomie

Après avoir été anesthésiées à l'isoflurane, les souris sont épilées bilatéralement dans une zone sous-costale d'environ  $1\text{cm}^2$ . Une incision des premier et deuxième plans est réalisée. Une fois l'ovaire repéré, il est désolidarisé de la trompe et la partie proximale de cette dernière est ligaturée (Prolene 6.0) ou simplement cautérisée. L'incision est refermée par une suture en surjet des deux plans (Dafilon 5.0), puis la plaie est nettoyée à la Bétadine dermique 10%. L'animal récupère durant les 7 jours qui suivent. Après avoir été ovariectomisée, la moitié des animaux est traitée quotidiennement par une injection sous-cutanée de  $17\beta$ Estradiol (0.1mg/kg/jour).

### b. Prélèvement des aortes

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale. Le plastron est éliminé grâce à 2 incisions latérales puis le cœur et les poumons de l'animal sont retirés délicatement. L'aorte est ensuite prélevée sans jamais être étirée. L'aorte thoracique est placée dans une solution physiologique tampon PSS-HEPES (PSS ; 130mM NaCl<sub>2</sub> ; 5,6mM KCl ; 1mM MgCl<sub>2</sub> ; 2g/L glucose ; 8mM Hépès pH 7,4 et 2mM Ca<sup>2+</sup>) puis nettoyée et coupée en anneaux de 2mm de longueur.

### c. Mesure de la contraction

La contraction des anneaux d'aorte est étudiée dans des cuves à organe isolé. Les anneaux sont montés en préservant l'endothélium et baignés dans 5mL d'une solution de Krebs à 37°C avec un bullage permanent (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). On effectue la pré-tension des fragments d'aortes puis le milieu est renouvelé et les anneaux sont laissés au repos pendant 1 heure. La contraction des anneaux est ensuite appréciée par le KCl (20 à 80mM) et la phényléphrine ( $10^{-10}$  à  $10^{-3}$ M). A la fin de chaque stimulation, la cuve est rincée trois fois par du Krebs et les anneaux sont laissés au repos durant 15 à 30 minutes. Toutes nos mesures sont réalisées en présence de L-NNA  $2.10^{-4}$ M pour s'affranchir des effets NO dépendants. Cette inhibition de la NOS est vérifiée par l'absence d'effet en réponse à  $10^{-5}$ M de carbachol (CCH).

### **3. Analyse statistique**

L'ensemble des résultats est présenté sous forme de moyenne +/- déviation standard, associé à la taille de la population : +/- sem (n=). Selon le cas, un test t de Student réalisé dans le cadre de ses conditions d'emploi (échantillon indépendant, normalité des données et égalité des variances) ou une analyse de variance (ANOVA) seront réalisés. Seuls les résultats dont  $p < 0.05$  sont considérés comme significatifs.



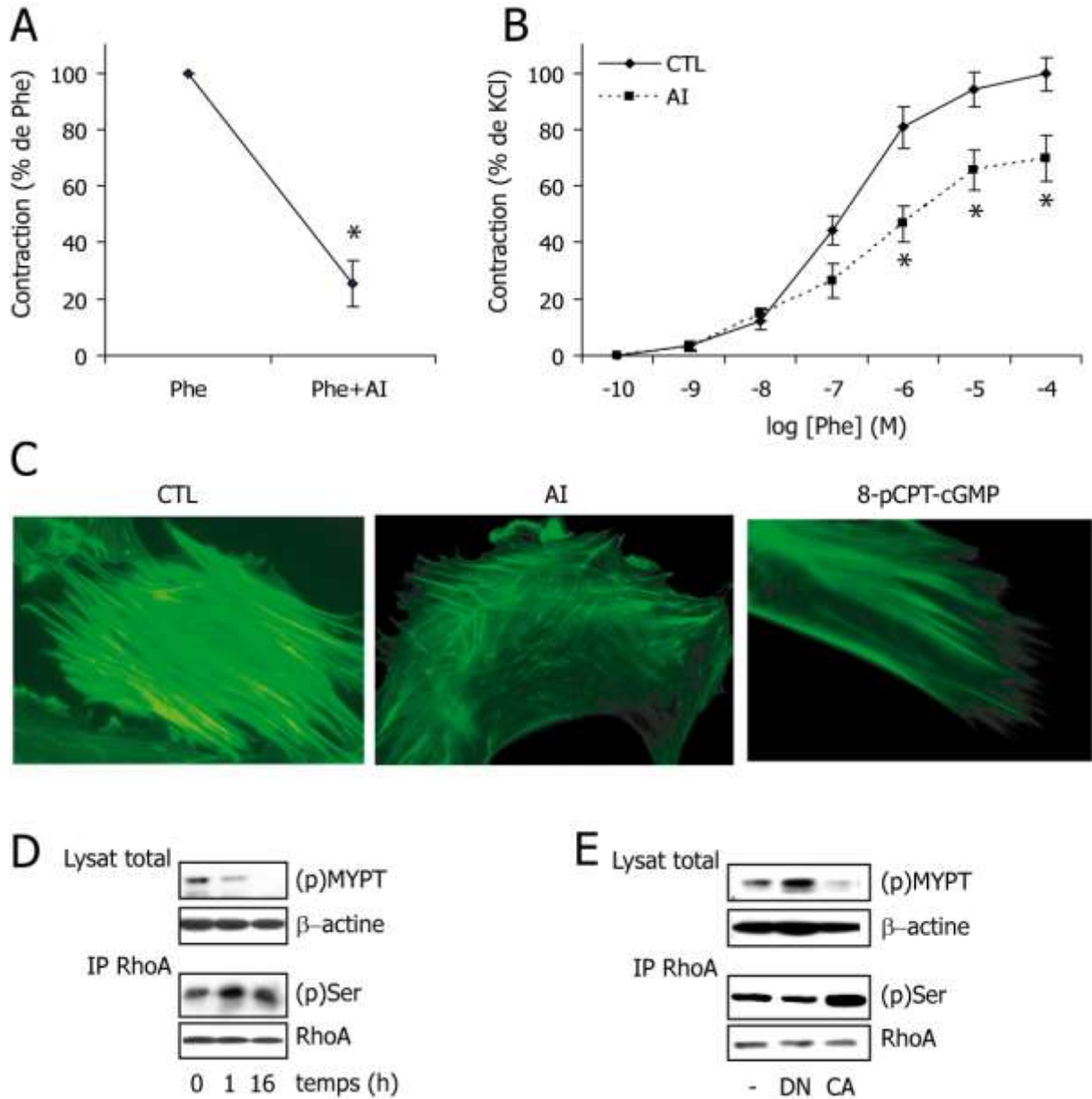
## RESULTATS

### 1. Signalisation

*Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée lors du Printemps de la Cardiologie 2010 (Annexe1), et donnera lieu à la publication d'un article, actuellement en préparation (Annexe2).*

#### **L'AMPK inhibe la voie RhoA-Rock.**

Afin d'évaluer l'effet de l'AMPK sur les CMLVs et en particulier sur la voie RhoA-Rock des CMLVs, nous analysons dans un premier temps l'impact de l'activation de l'AMPK sur la contraction d'anneaux d'aortes de souris. Lorsque des anneaux précontractés à la phényléphrine sont stimulés par un activateur de l'AMPK, l'AICAR, leur contraction est diminuée de manière significative (relaxation de  $74.6 \pm 8.06\%$ ) (Figure 12A). Lorsque des anneaux d'aortes de souris contrôles ou prétraités à l'AICAR sont stimulés par des concentrations croissantes de phényléphrine, la réponse à la phényléphrine est significativement diminuée chez le groupe de souris prétraitées (De 100% à  $69.73 \pm 8.15\%$  de contraction pour une dose de phényléphrine de  $10^{-4}\text{M}$ ) (Figure 12B). L'activation de l'AMPK est donc capable d'induire une vasodilatation d'anneaux d'aortes précontractés à la phényléphrine, mais également d'inhiber la contraction d'anneaux en réponse à la phényléphrine, et ce de manière NO-indépendante puisque ces expériences ont été réalisées en présence de L-NNA. Afin d'évaluer l'effet de l'AMPK sur la formation de fibres de stress, des CMLVs d'aortes de rat cultivées en présence de SVF sont traitées avec de l'AICAR. L'activateur de l'AMPK induit une diminution significative de la formation de fibres de stress, comparable à celle induite avec un traitement par un analogue de GMPc, activateur de la PKG (Figure 12C). L'activation de l'AMPK a donc un effet inhibiteur sur la formation de fibres de stress. Enfin, nous étudions l'effet de l'activation de l'AMPK sur la voie RhoA-Rock par western blot. Le traitement de CMLVs d'aortes de rats par l'AICAR réduit de manière significative la phosphorylation de MYPT et augmente celle de RhoA de façon temps dépendante. De la même manière, la phosphorylation de MYPT est diminuée dans les CMLVs exprimant la forme constitutivement active de l'AMPK alors que celle de RhoA est augmentée. A l'inverse, l'expression d'une forme DN de l'AMPK augmente la phosphorylation de MYPT et diminue celle de RhoA (Figure 12D et E). **Tous ces résultats montrent que l'activation de l'AMPK induit la phosphorylation de RhoA, l'inhibition de la voie RhoA-Rock, et inhibe la contraction d'anneaux d'aortes.**



**Figure 12 : L'AMPK inhibe la voie RhoA-Rock.** (A) Des anneaux d'aortes de souris C57Bl6 précontractés à la phényléphrine (Phe) sont stimulés par un activateur de l'AMPK, l'AICAR (AI) (3mM) pendant 60min. (B) Des anneaux d'aortes de souris C57Bl6 contrôles ou prétraités à l'AICAR sont stimulés par des concentrations croissantes de phényléphrine ( $10^{-10}$  à  $10^{-4}$ M). (C) Des fibres de stress de CMLs d'aortes de rat cultivées en présence de sérum sont colorées à la phalloïdine après traitement par l'AICAR (1mM pendant 16h) ou par un analogue du GMPc, le 8-pCPT-cGMP (100 $\mu$ M pendant 16h). (D) Des CMLVs sont stimulées par l'AICAR (1mM) pendant 1h et 16h ou (E) ont été transfectées avec le dominant négatif (DN) ou avec la forme constitutivement active (CA) de l'AMPK. L'activité de RhoA est suivie sur lysat total par la phosphorylation de MYPT et la phosphorylation sur sérine est analysée après immunoprécipitation de RhoA. La quantité de RhoA immunoprécipitée est contrôlée par un anticorps anti-RhoA, et le  $\beta$ -actine nous permet de vérifier que les quantités de protéines chargées sont équivalentes (n=3 à 5 ; \*p<0.05).

### **L'AMPK phosphoryle directement RhoA sur sa sérine 188.**

Pour savoir si la sérine en position 188 de RhoA pourrait être phosphorylée par l'AMPK, la séquence adjacente à la sérine 188 de RhoA est comparée à la séquence consensus de phosphorylation par l'AMPK, et à la séquence d'un peptide témoin substrat de l'AMPK, le peptide SAMS. Ces trois séquences présentent de fortes homologues (Figure 13A). En utilisant le programme PPSP de prédiction des sites spécifiques de phosphorylation de kinases (<http://ppsp.biocuckoo.org/index.php>), le score associé à la phosphorylation de RhoA sur la sérine en position 188 par l'AMPK est comparable à celui obtenu pour la phosphorylation de RhoA en S188 par la PKG (3.50 et 3.46 respectivement) pour une sensibilité équivalente (3.3 et 3.1 respectivement) (Figure 13B). La sérine 188 de RhoA apparaît donc comme un site préférentiel de phosphorylation par l'AMPK. De façon intéressante, le score associé à la phosphorylation de RhoA sur la sérine en position 73 est également comparable à celui obtenu pour la phosphorylation de RhoA en S73 par la PKG (Figure 13B). Nous réalisons finalement un essai kinase *in vitro* pour vérifier si l'AMPK peut phosphoryler la protéine de manière directe. L'AMPK phosphoryle la forme sauvage de RhoA et le peptide contrôle de manière comparable. En revanche l'AMPK ne phosphoryle pas le mutant non phosphorylable S188A de RhoA ni le GDI (Figure 13C). **Nous montrons ainsi que l'AMPK est capable de phosphoryler directement RhoA sur sa sérine en position 188.**

L'AMPK est une nouvelle kinase de RhoA capable d'induire l'inhibition la voie RhoA-Rock.

### **L'estradiol induit la phosphorylation de RhoA sur sa sérine 188 et inhibe la voie RhoA-Rock.**

Afin d'identifier un contexte physiologique dans lequel l'AMPK pourrait inhiber la voie RhoA-Rock en induisant la phosphorylation de RhoA, nous testons l'effet de l'E2 sur la voie RhoA-Rock. L'estradiol, un activateur de l'AMPK, possède des effets vasoprotecteurs et notamment un effet vasodilatateur dont le mécanisme d'action au niveau des CMLs est encore imprécis. Afin d'évaluer l'effet potentiel de l'E2 sur la voie RhoA-Rock, on observe dans un premier temps son effet sur la phosphorylation de RhoA et la phosphorylation de MYPT. Des CMLs qui surexpriment une protéine RhoA, sauvage (RhoA-WT) ou phosphorésistante (RhoA-S188A), sont stimulées par l'E2. Après 6 heures de traitement, la phosphorylation de la forme sauvage de RhoA est significativement augmentée mais reste inchangée lorsqu'il s'agit de la forme non-phosphorylable S188A (Figure 14A). **L'estradiol induit donc la phosphorylation de RhoA sur sa sérine 188.** Cette phosphorylation augmente de façon dose-dépendante (Figure 14B) tandis que la phosphorylation de MYPT diminue significativement sous l'action de l'E2 (Figure 14C). La stimulation des CMLs par une concentration physiologique d'estradiol pendant 0.5 à 20h induit une augmentation de la phosphorylation de RhoA

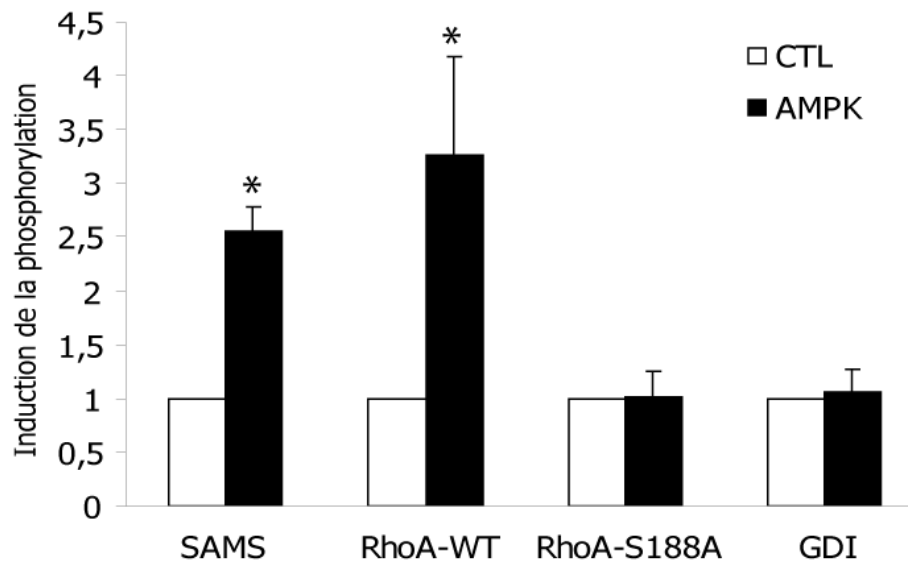
A

Consensus	f(X,b)XX <b>S</b> TXXXf	f=MVLIF ; b=R>K>H
SAMS	HMRSAM <b>S</b> GLHLVKKR	
RhoA	GKKK <b>S</b> GCLVL	

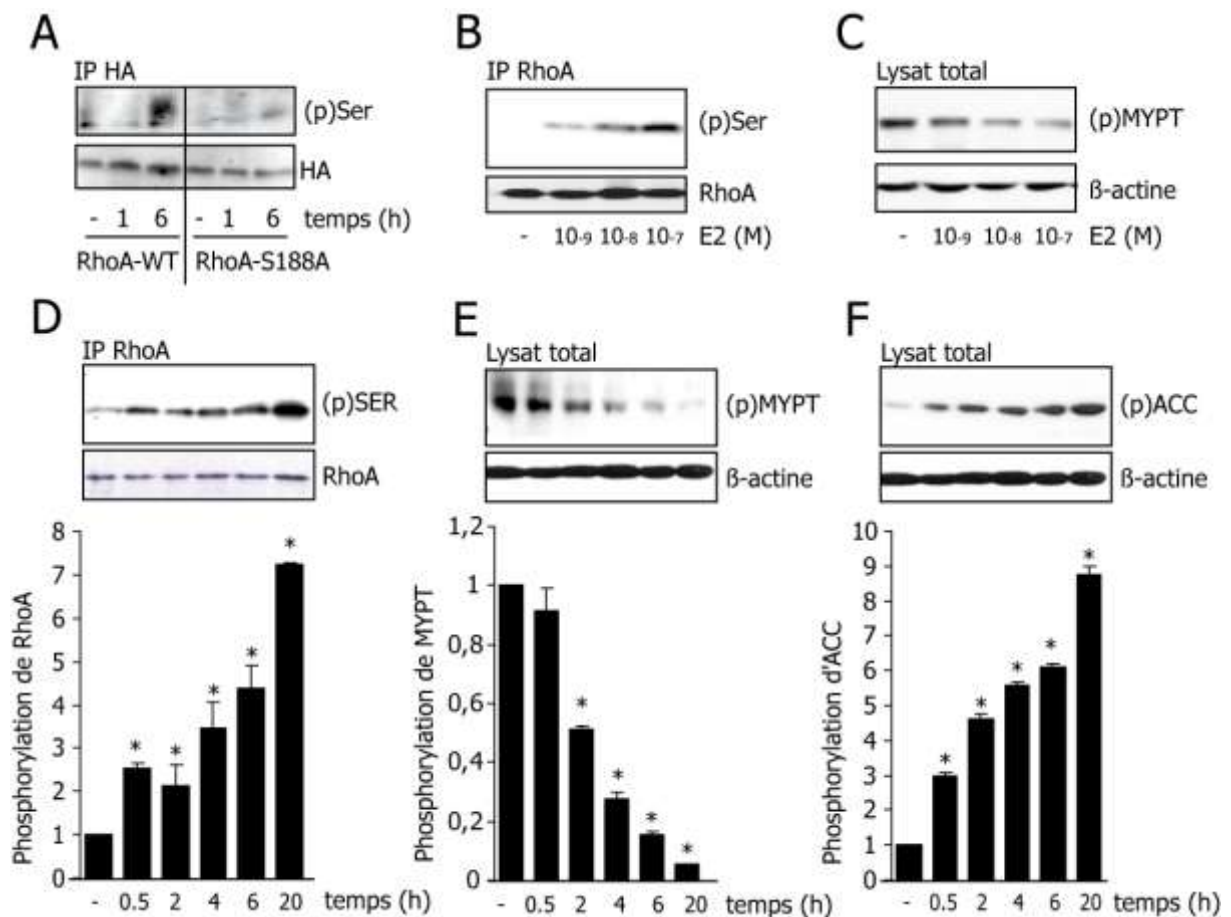
B

Name	Position	Kinase	Peptide	Threshold	Risk-Diff.
RhoA	73	AMPK	LRPLSY PDT	3.3	5.10
RhoA	188	AMPK	GKKKSGCLV	3.3	3.50
RhoA	73	PKG	LRPLSY PDT	3.1	4.77
RhoA	188	PKG	GKKKSGCLV	3.1	3.46

C



**Figure13 : L'AMPK phosphoryle directement RhoA sur sa sérine 188.** (A) La séquence adjacente à la sérine 188 de RhoA sur sa sérine 188 est alignée avec la séquence consensus de phosphorylation par l'AMPK et celle du peptide contrôle (SAMS). (B) Comparaison des sites spécifiques de phosphorylation de RhoA par la PKG et par l'AMPK prédits *in silico* à l'aide du programme PPSP (Prediction of PK-Specific Phosphorylation Site). (C) Essai kinase avec comme substrats pour l'AMPK le peptide contrôle (SAMS), RhoA de type sauvage (RhoA-WT), le mutant non phosphorylable de RhoA (RhoA-S188A) et le GDI (n=3 à 5 ; \*p<0.05).



**Figure 14 : L'estradiol induit la phosphorylation de RhoA sur sa sérine 188, inhibe la voie RhoA-Rock et active la voie de l'AMPK. (A)** Des CMLs sont transfectées avec la forme sauvage de RhoA (RhoA-WT) ou le mutant non phosphorylable sur sérine 188 (RhoA-S188A). Ces deux formes de RhoA sont marquées par le peptide HA. Dans ces conditions, les CMLs sont stimulées pendant 1h et 6h par l'E2 ( $10^{-9}$ M). La phosphorylation sur sérine est suivie après immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-HA et l'expression des mutants est contrôlée par l'expression de HA. **(B)** Des CMLs sont stimulées pendant 6h par des concentrations croissantes d'E2 ( $10^{-9}$  à  $10^{-7}$ M), puis la phosphorylation sur sérine est analysée après immunoprécipitation de RhoA. La quantité de RhoA immunoprécipitée est contrôlée par un anticorps anti-RhoA. **(C)** L'activité de la voie RhoA-Rock est suivie par la phosphorylation de MYPT. **(D)** Des CMLs sont stimulées par l'E2 ( $10^{-9}$ M) pendant 30 minutes, 2, 4, 6 et 20h. La phosphorylation sur sérine de RhoA est suivie après immunoprécipitation de RhoA. **(E)** L'activité de RhoA est suivie par la phosphorylation de MYPT. La  $\beta$ -actine nous permet de vérifier que les quantités de protéines chargées sont équivalentes. **(F)** Des CMLs sont stimulées par l'E2 ( $10^{-9}$ M) pendant 30 minutes, 2, 4, 6 et 20h. L'activité de l'AMPK est suivie par la phosphorylation d'ACC (n=3 à 5 ; \*p<0.05).

corrélée à une diminution significative de la phosphorylation de MYPT (Figure 14D et 14E). **Nous montrons ainsi que l'estradiol induit la phosphorylation de RhoA et inhibe la voie RhoA-Rock.** De manière intéressante, lorsque des CMLs en culture avec 10% de SVF sont traitées par l'estradiol pendant différents temps, la phosphorylation d'ACC, un substrat direct de l'AMPK, est 9 fois plus élevée à 20 heures qu'au temps zéro (n=2 ; p<0.05) (Figure 14F). **Ces résultats indiquent que l'estradiol induit également l'activation de la voie de l'AMPK.**

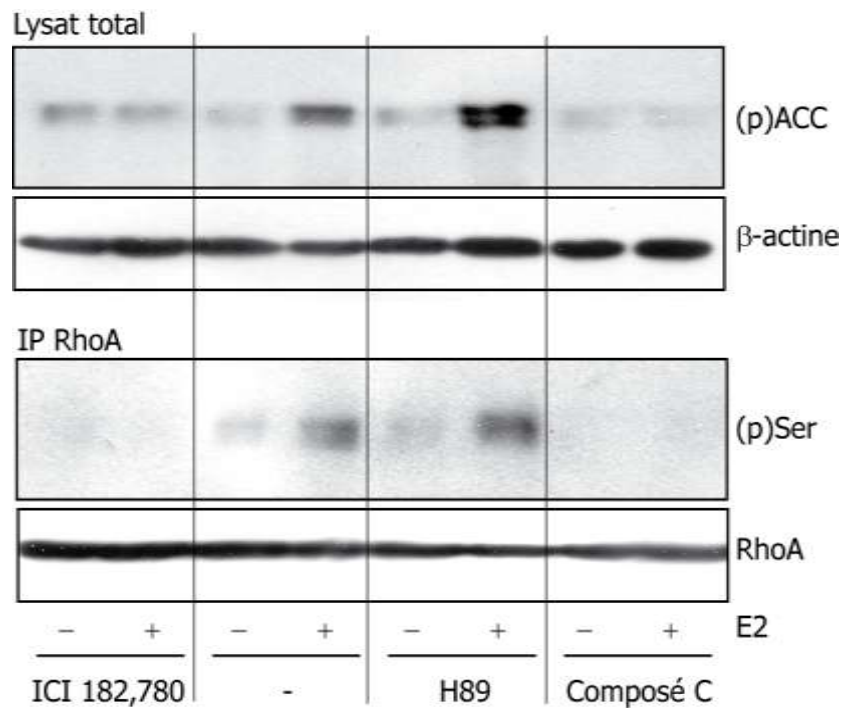
#### **L'estradiol induit la phosphorylation de RhoA via l'AMPK.**

Afin de savoir si la phosphorylation de RhoA par l'estradiol met en jeu l'AMPK, des CMLs d'aortes de rat sont traitées par l'estradiol en concentration physiologique, en présence du composé C, inhibiteur de l'AMPK (Figure15). L'augmentation de la phosphorylation d'ACC et de celle de RhoA induites par l'E2 est inhibée en présence de ce composé C. **L'estradiol induit donc la phosphorylation de RhoA via l'AMPK.** Comme il avait déjà été montré que l'E2 pouvait aussi activer la PKA, nous avons testé l'implication potentielle de cette kinase en prétraitant les cellules avec un de ses inhibiteurs, le H89. Dans les conditions contrôles, comme en présence de l'inhibiteur de la PKA, l'estradiol induit une augmentation de la phosphorylation d'ACC, corrélée à une augmentation de la phosphorylation de RhoA. **L'activation de l'AMPK et la phosphorylation de RhoA induites par l'estradiol ne sont donc pas liées à l'activation de la PKA.** Enfin, nous notons qu'en présence du fulvestrant, un inhibiteur des récepteurs aux estrogènes, ni la phosphorylation d'ACC, ni celle de RhoA ne varient sous l'action de l'estradiol. **L'estradiol induit l'activation de l'AMPK et la phosphorylation de RhoA par activation de ses récepteurs.**

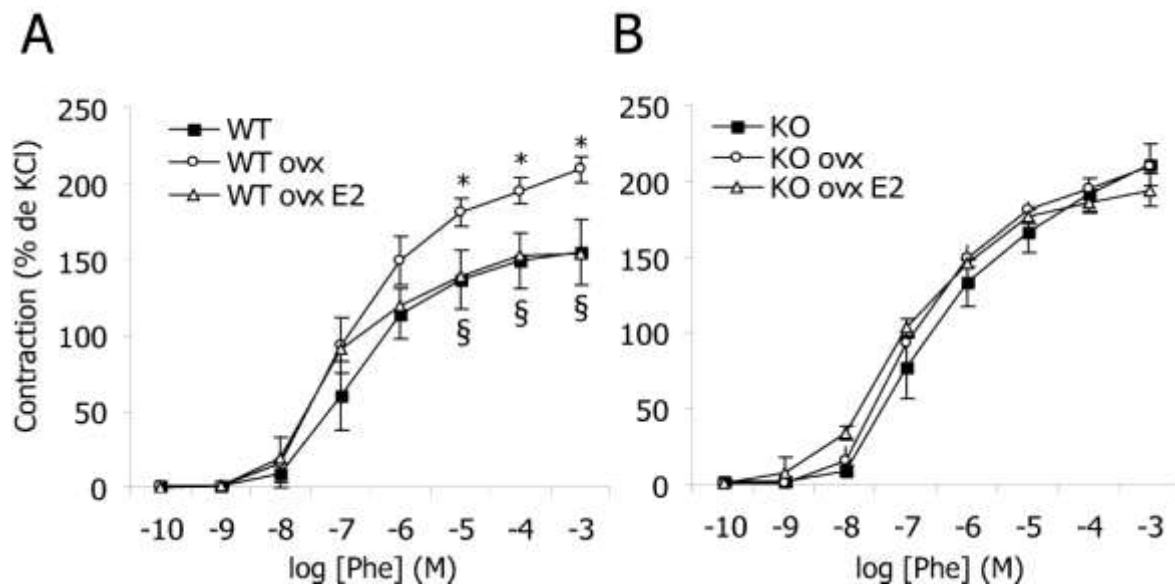
Par activation de ses récepteurs, l'estradiol induit la phosphorylation de RhoA et inhibe la voie RhoA-Rock par action de l'AMPK.

#### **L'estradiol a des effets vasoprotecteurs via l'AMPK.**

Afin d'évaluer l'impact physiologique de l'effet de l'estradiol et de l'AMPK sur la voie RhoA-Rock, nous réalisons des études de vasoréactivité sur les anneaux d'aortes de 6 groupes de souris. L'effet de l'AMPK est en effet mis en évidence par l'utilisation de souris femelles sauvages (WT) versus knock-out pour la sous-unité  $\alpha 1$  de l'AMPK (KO). Nous utilisons d'autre part l'ovariectomie totale bilatérale avec ou sans traitement quotidien à l'E2 afin d'évaluer l'effet de l'estradiol. La contraction maximale en réponse à 60mM de KCl est identique pour tous les groupes (données non présentées). Pour le groupe de souris sauvages, la réponse à la phényléphrine est 30%



**Figure15 : L'estradiol induit la phosphorylation de RhoA via l'AMPK.** Des CMLs sont stimulées par l'E2 ( $10^{-9}$ M) après 45 minutes de prétraitement par un antagoniste des récepteurs aux estrogènes (ICI 182,780 ou fulvestrant,  $1\mu$ M), un inhibiteur de PKA (H89,  $10\mu$ M) ou un inhibiteur de l'AMPK (Composé C,  $10\mu$ M). L'activité de l'AMPK est suivie par la phosphorylation d'ACC. La  $\beta$ -actine nous permet de vérifier que les quantités de protéines chargées sont équivalentes. La phosphorylation sur sérine est analysée après immunoprécipitation de RhoA. La quantité de RhoA immunoprécipitée est contrôlée par un anticorps anti-RhoA.



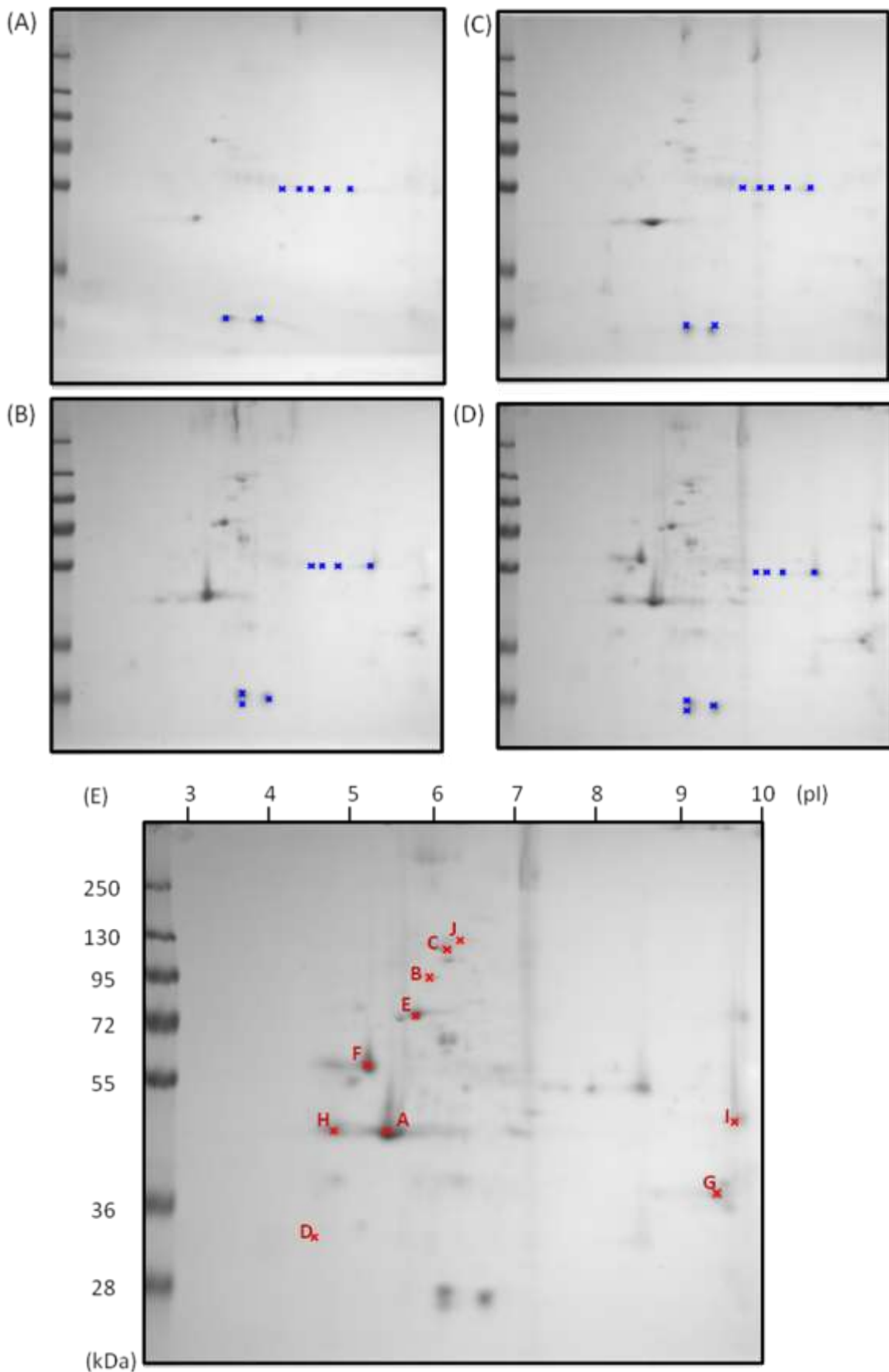
**Figure16 : L'estradiol a des effets vasoprotecteurs via l'AMPK.** Des anneaux d'aortes de souris C57Bl6 de type sauvage (WT) ou knock-out pour la sous-unité  $\alpha 1$  de l'AMPK (KO), ovariectomisées (ovx) ou non, et plus ou moins traitement quotidien par l'estradiol ( $0.1\text{mg/kg/j}$ ) (E2) sont stimulés par des concentrations croissantes de phényléphrine ( $10^{-10}$  à  $10^{-3}$ M) ( $n=4$ ; \* $p<0.05$  WT ovx versus WT ; § $p<0.05$  WT ovx E2 versus WT ovx).

plus importante chez les souris ovariectomisées (WT ovx) par rapport au groupe de souris contrôles (WT) (Figure 16A). En revanche lorsque les souris ovariectomisées sont traitées quotidiennement avec l'estradiol (WT ovx E2), la réponse à la phényléphrine est identique au groupe contrôle. La supplémentation en estradiol restaure complètement la fonction contractile des souris. **L'estradiol a donc un effet vasoprotecteur.** Pour le groupe de souris knock-out, la réponse à la phényléphrine est identique pour tous les animaux (Figure 16B) et comparable à celle des animaux sauvages ovariectomisés et non supplémentés en estradiol. **L'AMPK est donc nécessaire à l'un des effets vasoprotecteurs induits par l'estradiol.**

## 2. Nouveaux partenaires de pRhoA.

Afin d'identifier les différents partenaires de RhoA phosphorylée, nous utilisons la protéomique de complexes. Les lysats des cellules contrôles, et ceux des cellules dont la phosphorylation de RhoA a été induite par traitement au SNP ou à l'estradiol sont immunoprécipités puis soumis à une migration selon deux dimensions (Figure17). Dix spots, nommés de A à J, ont été excisés et analysés par spectrométrie de masse. Six protéines ont ainsi été identifiées par la technique MALDI-TOF, dont la moitié est retrouvée lors des deux types de stimulation indifféremment. Ces protéines sont listées dans le tableau I. Les quatre protéines non-identifiées sont en cours d'analyse par nano-LC –cut-off. Nous retrouvons parmi ces candidats des protéines du cytosquelette : la  $\beta$ -actine, la Gelsoline, l'Ankycorbine et la Vimentine. Mais une Heat shock protein Hsp70/GRP75 et la Myosin phosphatase-Rho interacting protein M-RIP ont également été mises en évidence. Le tableau II récapitule une estimation des variations d'appartenance au complexe des ces protéines dans les différentes conditions expérimentales. Plusieurs partenaires de la protéine RhoA phosphorylée ont ainsi été identifiés.





**Figure17 : Analyse des partenaires de RhoA après induction de sa phosphorylation.** Images de gels 2D colorés au bleu de coomassie, après migration d'un échantillon de protéines immunoprécipitées de lystats de CMLVs CTL (A) et (B), ou traitées pendant 60 minutes par l'E2 (C) ou le SNP (D) et sur lesquels ont été identifiées les IgG (en bleu). 10 spots (A à J) ont été prélevés (E).

Numéro de spot	SNP			E2			
	S15	S60	C60	C15	E15	E60	C60
A	++	++++	+++	+++	+++	++++	++
B		+	+/-			+	
C	+	++	+				
D	+	++	+			+	
E	+	++	++		++		
F	+++	++					
G	++++	+++	++	+	+	+	+
H	+/-	++	+			+	
I	+++	++	+				
J		++	+/-				

**Tableau I : Tableau récapitulatif des protéines prélevées (A à J) pour identification et de leurs variations d'appartenance au complexe protéique incluant RhoA.** Les protéines immunoprécipitées sont issues de CMLVs traitées par SNP ou par l'estradiol pendant 15 minutes (S15 ou E15 respectivement) ou 60 minutes (S60 ou E60 respectivement), ou traitées par le solvant (C15 et C60). L'appartenance au complexe varie de non détectable ( ), à ++++.

Numéro de spot	Nom de la protéine	Numéro d'accèsion	Masse moléculaire (Da)	Point isoélectrique	Score
A	$\beta$ -actine	P60711	42052	5.29	179
B	Gelsoline	Q68FP1	86413	5.76	86
C	Ankycorbine	Q5U312	109637	5.81	82
E <sub>1</sub>	Hsp70 /GRP75	P48721	74097	5.97	194
E <sub>2</sub>	$\beta$ -actine	P60711	42052		82
F	Vimentine	P31000	53757	5.06	46
J	M-RIP	Q9ERE6	117896	5.95	63

**Tableau II : Liste des protéines identifiées par la technique MALDI-TOF.**

## DISCUSSION

La phosphorylation de RhoA est un mécanisme important de régulation de l'activité de la protéine, sans que l'on sache précisément quelles sont, *in vivo*, les conséquences du changement de cet état de phosphorylation. Avec ce travail, nous avons identifié une nouvelle kinase de RhoA, l'AMPK, capable de la phosphoryler sur son résidu sérine en position 188. De nombreux travaux ont déjà mis en évidence un effet vasoprotecteur de l'AMPK, mais seuls les effets dépendants de l'endothélium ont été bien décrits. Goirand *et al.* avaient mis en évidence une composante endothélium-indépendante responsable de l'effet vasodilatateur de l'activation de l'AMPK $\alpha$ 1 (Goirand *et al.*, 2007). Notre travail, non seulement confirme cet effet vasodilatateur de l'AMPK $\alpha$ 1 dans les CMLVs, mais montre également un effet chronique de l'AMPK $\alpha$ 1 qui limite la vasoconstriction. Nous avons de plus identifié le mécanisme moléculaire responsable de ces effets, et un activateur physiologique de l'AMPK : l'estradiol.

Nous avons montré que, tout comme les autres kinases de la petite protéine G identifiées jusqu'à présent, l'AMPK phosphoryle directement RhoA sur son résidu sérine en position 188. L'étude *in silico* des sites spécifiques de phosphorylation de RhoA par la PKG et par l'AMPK a cependant révélé deux sites de phosphorylation préférentiels: S188 et S73 (Figure 13B). Or la sérine 73 apparaît également un bon site de phosphorylation pour la PKA (données non présentées). Tandis que des études ont déjà montré que la phosphorylation de RhoA par la PKA ou la PKG n'impliquait pas S73 (Sawada *et al.*, 2001), la phosphorylation de cette sérine n'a pas été étudiée ici. Une étude de Schoentaube *et al.* indique pourtant que la phosphorylation de Rac1 sur sérine 71, équivalente à la phosphorylation de RhoA en S73, induit une diminution de liaison au GTP et pourrait également affecter la liaison de Rac1 à ses effecteurs (Schoentaube *et al.*, 2009). L'état de phosphorylation de cette sérine serait donc à étudier afin de définir si la Ser188 est le seul site de phosphorylation de l'AMPK.

La définition de RhoA comme nouveau substrat de l'AMPK nous permet de réenvisager le rôle de la phosphorylation de RhoA dans des processus dépendants de l'AMPK, et notamment dans le cadre du traitement du diabète de type 2. Cette pathologie se caractérise par une résistance à l'insuline au cours de laquelle la capture et l'utilisation du glucose sont considérablement réduites. À l'état physiologique, l'AMPK joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du glucose en agissant notamment au niveau du foie et des muscles squelettiques. Elle inhibe en effet la production de glucose et diminue la lipogenèse au niveau du foie, tandis qu'elle augmente la capture du glucose et l'oxydation des acides gras au niveau des muscles squelettiques (Zhang *et al.*, 2009 ; Nagata & Hirata, 2010). Les pathologies diabétiques sont également fréquemment associées à des dysfonctions du système cardiovasculaire qui aboutissent à une augmentation de la pression sanguine, une

augmentation de la formation de thrombus et une réduction de la fibrinolyse, ainsi qu'une relaxation vasculaire altérée. La metformine, qui fait partie des agents thérapeutiques les plus utilisés chez les sujets diabétiques, exercerait une partie de ses effets via l'AMPK. Parmi les effets bénéfiques qui lui ont été attribués, une étude a permis de montrer qu'*in vitro* ou chez des rongeurs utilisés comme modèles de diabète de type 2, la metformine améliorerait les fonctions endothéliales en favorisant la phosphorylation de l'eNOS par activation de l'AMPK (Davis *et al.*, 2006). La metformine pourrait également induire une vasodilatation d'aortes de rats désendothélialisées précontractées à la phényléphrine (Majithiya & Balaraman, 2006). En plus de son implication dans la régulation du métabolisme du glucose, l'AMPK intervient donc également dans le maintien et l'amélioration des fonctions cardiovasculaires altérées au cours des pathologies diabétiques, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle dans la prévention et le traitement du diabète de type 2. De façon intéressante, une autre équipe a récemment montré que la phosphorylation de RhoA apparaissait diminuée dans le cœur de rats diabétiques (Soliman *et al.*, 2008). Une partie des effets bénéfiques de l'AMPK au niveau cardiovasculaire pourrait donc s'expliquer par sa capacité à phosphoryler RhoA. Notre équipe a montré qu'au niveau de l'artère pulmonaire, la metformine prévient l'activation de la voie RhoA-Rock et de ce fait inhibe le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire (Agard *et al.*, 2009). Nos travaux laissent penser qu'il pourrait en être de même au niveau de la circulation générale, et qu'ainsi une partie des effets bénéfiques de l'activation de l'AMPK par la metformine pourrait être due à la phosphorylation de RhoA. Ainsi, l'induction de la phosphorylation de RhoA par l'AMPK pourrait limiter les effets néfastes associés à la dysfonction endothéliale retrouvée au cours du diabète de type 2.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés aux autres effets potentiels de la phosphorylation de RhoA, ainsi qu'aux régulateurs possibles de cette phosphorylation. Dans la seconde partie de ce travail nous avons donc essayé de mettre en évidence d'éventuels partenaires de RhoA phosphorylée, que ce soit par la voie NO/PKG, ou sous l'effet de l'estradiol via l'AMPK. Plusieurs protéines du cytosquelette ont ainsi été identifiées : l'Actine, la Vimentine, la Gelsoline et l'Ankycorbone. Compte-tenu de l'implication conséquente de RhoA dans les phénomènes de réorganisation du cytosquelette, ces résultats ne sont pas surprenants. En revanche, au cours de cette analyse, deux autres protéines ont retenu plus particulièrement notre attention.

M-RIP, une protéine interagissant avec le cytosquelette, a ainsi également été identifiée. Comme il a été décrit plus tôt, la contractilité des CMLVs est directement reliée à la MLC, qui est activée par la MLCK et déphosphorylée par la MCLP. La MCLP est elle-même activée par des agents vasodilatateurs, ou inhibée par des vasoconstricteurs. Ainsi, l'activation de la voie RhoA-Rock par un vasoconstricteur induit la phosphorylation de la MLCP et son inhibition. Par ce mécanisme, l'activation de la voie RhoA-Rock est également associée à la formation de fibres de stress d'actine. M-RIP (Myosin phosphatase-rho interacting protein) est une protéine identifiée récemment, capable de

se lier à la fois à RhoA et à la MLCP, mais qui interagit également avec l'actine. M-RIP est ainsi responsable de la colocalisation de RhoA et de la MLCP au niveau des filaments d'actine, permettant de ce fait la régulation de la MLCP via RhoA-Rock. M-RIP ne semble toutefois pas capable de lier Rock et l'adressage de cette kinase au niveau des filaments d'actine pourrait donc impliquer un autre mécanisme (Riddick *et al.*, 2008). Avec cette étude, nous notons que M-RIP serait également capable de se lier à RhoA lorsque la protéine est phosphorylée. Cependant, la phosphorylation de RhoA a habituellement été associée à une inhibition de la formation de fibres de stress (Sauzeau *et al.*, 2000 ; Ellerbroek *et al.*, 2003), ce qui a également été observé au cours de cette étude lors de la stimulation par l'AMPK. Ces résultats renforceraient ainsi l'hypothèse selon laquelle la localisation de Rock au niveau des filaments d'actine impliquerait un autre mécanisme. La phosphorylation de RhoA, en inhibant ce mécanisme d'adressage, pourrait ainsi empêcher la formation de fibres de stress. Des études de localisation de RhoA phosphorylée et de Rock au sein de la cellule pourraient être entreprises afin de vérifier cette hypothèse.

Enfin l'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier Hsp70, comme partenaire de RhoA phosphorylée. Cette protéine de stress appartient à une superfamille de protéines (Heat Shock Protein) produites par les cellules en cas de stress environnemental ou métabolique comme une ischémie, un stress mécanique ou lié à une chirurgie, l'éthanol ou encore la nicotine (Bielecka-Dabrowa *et al.*, 2009). Parmi les 6 familles d'HSPs composant cette superfamille et classées selon leur poids moléculaires, le groupe formé par les protéines de 70kDa (Hsp70) est le plus étudié. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence un effet protecteur d'Hsp70 sur le plan cardiovasculaire. Au niveau cardiaque, l'induction d'Hsp70 aurait effectivement un effet protecteur sur les cardiomyocytes aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo* (Bornfeldt, 2000). Hsp70 inhiberait d'autre part la prolifération des cellules musculaires lisses induite par l'angiotensine II (Zheng *et al.*, 2006) et pourrait protéger les protéines cytoplasmiques des effets délétères du stress oxydatif induit par l'angiotensine II (Krishna *et al.*, 2007). Enfin, Hsp70 exercerait une action bénéfique dans l'athérosclérose (Bielecka-Dabrowa *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'implication de protéines HSPs dans la régulation des protéines Rho a déjà été mise en évidence. En effet, avec leur étude, Garcia *et al.* montrent la participation d'Hsp27 dans l'activation de RhoA induite par l'acide arachidonique. Une fois phosphorylée via p38MAPK, la protéine Hsp27 se lie à p115RhoGEF et permet l'activation de RhoA (Garcia *et al.*, 2009). Dans ce contexte, l'étude des effets de l'interaction de cette protéine avec RhoA phosphorylée semble une voie intéressante.

L'étude de l'impact physiologique de l'inhibition de la voie RhoA-Rock par l'AMPK a été réalisée en utilisant l'estradiol. Il avait déjà été montré que l'estradiol pouvait activer l'AMPK, mais uniquement dans le muscle strié (D'Eon *et al.*, 2005 ; D'Eon *et al.*, 2008), et au vu de ses effets en physiologie et physiopathologie vasculaires, il paraît intéressant de définir ses cibles dans les vaisseaux. De fait, l'estradiol a souvent été associé à l'augmentation des troubles cardiovasculaires

observés chez la femme après la ménopause. En effet, il est établi que jusqu'à 50 ans, la fréquence de ces maladies et le niveau de mortalité cardiovasculaire sont 2 à 4 fois moins importants chez la femme que chez l'homme. Toutefois, l'incidence de ces maladies augmente ensuite chez la femme pour se rapprocher de celle des hommes vers 65 ans (Isles *et al.*, 1992). La disparition des estrogènes faisant suite à la ménopause a ainsi été soupçonnée et de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer les bénéfices de l'hormonothérapie de remplacement sur le risque cardiovasculaire. Les études ont tout d'abord mis en évidence un effet protecteur de l'hormonothérapie de remplacement au niveau cardiovasculaire. Cet effet n'était toutefois pas retrouvé chez toutes les femmes ménopausées. Basé sur le fait que l'effet biologique de l'estradiol est médié par les ERs, il a été avancé que le manque d'effets protecteurs de l'estradiol pourrait être dû à une diminution de l'expression des ERs. Cette hypothèse était cependant contredite par le fait que la prévalence des maladies cardiovasculaires ne semblait pas augmentée chez les sujets sans ERs et qu'il n'y avait pas d'association possible entre le polymorphisme des ERs et la sévérité angiographique de l'atteinte de l'artère coronaire. Une autre hypothèse a été formulée, basée sur le fait que des différences dans la métabolisation de l'estradiol pourraient être en partie responsables de l'inconstance des effets cardioprotecteurs de l'estradiol. Ces différences dans le métabolisme peuvent avoir plusieurs origines comme l'alimentation, la fumée de cigarette, les agents environnementaux, ou les médicaments, qui influencent l'activité du CYP450 et donc le métabolisme de l'estradiol. La capacité de métabolisation de l'estradiol varie donc fortement entre les individus, ce qui pourrait expliquer la fluctuation des effets cardioprotecteurs du traitement hormonal substitutif (THS) (Dubey & Jackson, 2001). Par la suite, alors que plusieurs études d'observation avaient mis en évidence une réduction significative du risque de cardiopathie coronarienne chez les femmes bénéficiaires du THS, la publication des résultats de l'étude clinique WHI (Women's Health Initiative), en 2002, a montré que non seulement l'hormonothérapie de remplacement ne préviendrait pas la survenue de pathologies cardiaques chez la femme en bonne santé, mais elle entraînerait en plus une augmentation de ce risque (Shifren & Schiff, 2010). Après réanalyse des résultats de l'essai WHI, il semble que le moment où est débuté le THS soit déterminant (« timing hypothesis »). Cette nouvelle analyse montre en effet que l'augmentation du risque de cardiopathie coronarienne concerne principalement les femmes qui comptent un certain nombre d'années après la ménopause. Aucune augmentation de ce risque n'a en revanche été retrouvée chez les femmes âgées de 50 à 59 ans et celles qui se trouvent dans les 10 premières années après la ménopause. Le THS pourrait ainsi avoir un effet bénéfique sur le cœur s'il est initié tôt au moment de la périménopause, quand les artères coronaires sont relativement saines, mais pourrait avoir un effet néfaste s'il est débuté chez des femmes plus âgées, quand une athérosclérose avancée est présente (Shifren & Schiff, 2010). Grâce aux nombreuses études expérimentales, plusieurs effets bénéfiques de l'estradiol ont toutefois pu être mis en évidence au niveau vasculaire. L'E2 possède en outre des propriétés anti-inflammatoires, stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et induit une vasodilatation rapide (Simoncini *et al.*, 2006). Cet effet vasodilatateur a été décrit a de

nombreuses reprises. L'E2 régule le tonus vasculaire par des effets à court ou long terme sur les vaisseaux (Mendelsohn & Karas, 1999). Sous l'action des estrogènes, on note ainsi une augmentation de l'expression de l'eNOS, qui permet la synthèse de NO au niveau de l'endothélium (Gui *et al.*, 2008). L'estradiol est également capable d'augmenter la synthèse de la prostacycline, vasodilatatrice, et de diminuer l'expression de l'endothéline-1, puissant vasoconstricteur (Lahm *et al.*, 2008). Le médiateur majeur des effets vasculaires de l'E2 est le NO produit par les cellules endothéliales, cependant des mécanismes d'action endothélium-indépendants ont également été décrits. Notre étude présente un nouveau mécanisme d'action non transcriptionnel. Nous avons montré dans un premier temps que l'estradiol a un effet inhibiteur sur la voie RhoA-Rock par phosphorylation de RhoA. Ces résultats concordent avec de précédentes observations selon lesquelles on a une diminution de l'activité de Rock sous l'effet de l'estradiol (Chrissobolis *et al.*, 2004). Dans un deuxième temps, l'étude nous a permis d'écarter l'hypothèse selon laquelle cet effet puisse être lié à PKA. L'estradiol est effectivement capable d'activer cette dernière (Ding *et al.*, 2009) dont les effets inhibiteurs sur la voie RhoA-Rock par phosphorylation de RhoA ont déjà été décrits (Lang *et al.*, 1996). On a ainsi pu impliquer directement l'AMPK dans cet effet de l'estradiol.

Les études réalisées *ex-vivo* nous ont permis de mettre en évidence l'effet vasoprotecteur de l'estradiol et de l'AMPK. Afin d'évaluer l'impact physiologique de l'AMPK, un modèle de souris knock-out pour la sous-unité  $\alpha 1$  de l'AMPK a été utilisé lors de ces expériences. Bien que les souris double knock-out ne soient pas viables, ces souris  $\alpha 1^{-/-}$  ne présenteraient pas de phénotype particulier en dehors d'une hypertrophie de la rate (Föller *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010). De même, il semble qu'invalider l'isoforme AMPK $\alpha 1$  n'induit pas de phénomène d'hypertension (données non présentées). Nous avons démontré que l'effet observé impliquait bien l'estradiol. Dans un premier temps, le modèle de ménopause utilisé, ovariectomie +/- supplémentation en estradiol, nous a effectivement permis d'éliminer tout effet lié à l'action éventuelle de la progestérone, également produite par l'ovaire. Par la suite, nous avons établi que l'effet vasoprotecteur n'était pas non plus lié à l'action d'un métabolite de l'estradiol. Certains métabolites de l'estradiol et de l'estrone possèdent en effet une activité biologique. Ils pourraient notamment être impliqués dans l'étiologie de cancers des tissus reproducteurs (Dubey & Jackson, 2001). Le 2-hydroxyestradiol se lie par exemple irréversiblement à des protéines et des acides nucléiques causant des dommages à l'ADN, et représentant potentiellement une étape d'initiation dans le cancer du sein ou de l'utérus (Miller & Duckles, 2008). La conversion du 2-hydroxyestradiol par la COMT ou sa biotransformation en glucuronides, et possiblement en conjugués sulfatés sont donc considérées comme une étape de détoxification dans le métabolisme des estrogènes (Raftogianis *et al.*, 2000 ; Miller & Duckles, 2008). Ces métabolites ont aussi des effets importants et concentrations-dépendants sur les CMLVs et sur les cellules endothéliales (Miller & Duckles, 2008), et les effets cardiovasculaires de l'estradiol pourraient donc représenter les effets biologiques de l'estradiol en lui-même mais également ceux de ses métabolites biologiquement actifs (Dubey & Jackson, 2001). La génération d'agents vasodilatateurs

pourrait médier les effets vasodilatateurs du 2-hydroxyestradiol. Le 2-méthoxyestradiol induit en effet la production de NO dans des cellules endothéliales de carotide bovine en culture. Puisque le 2-hydroxyestradiol est rapidement converti en 2-méthoxyestradiol par la COMT et que la COMT est très exprimée dans les cellules endothéliales de l'artère coronaire, les effets vasodilatateurs du 2-hydroxyestradiol pourraient être médiés par la production de NO sous l'influence du 2-méthoxyestradiol (Dubey *et al.*, 2004). Enfin, l'effet antioxydant de ces deux métabolites pourrait potentialiser l'effet de libération du NO en conditions basales en prévenant l'oxydation du NO (Dubey *et al.*, 2004). Ici, l'expérience réalisée avec le 2-méthoxyestradiol (2-ME), et toujours en présence de L-NNA, ne modifie ni la réponse à la phényléphrine, ni l'inhibition de la voie RhoA-Rock (données non présentées). Ces résultats concordent de plus avec les résultats d'études précédentes (Gui *et al.*, 2008 ; Dubey & Jackson, 2009) qui indiquent que le 2-ME est bien capable d'inhiber la contraction mais que cet effet s'effectue de façon dépendante de l'endothélium, via le NO. Finalement, nous montrons *ex-vivo* que l'effet de l'estradiol implique bien l'AMPK. L'estradiol agit donc via l'AMPK pour inhiber la voie RhoA-Rock et moduler la réactivité vasculaire. De cette manière, nous avons identifié une nouvelle voie de régulation de la contraction vasculaire par l'estradiol et il serait intéressant d'analyser l'activation de l'AMPK et la phosphorylation de RhoA dans les vaisseaux de femmes ménopausées.

**En conclusion, avec ce travail nous avons mis en évidence une nouvelle kinase de RhoA, l'AMPK, qui phosphoryle la protéine sur sa sérine en position 188. Les expériences réalisées avec l'estradiol indiquent de plus que l'AMPK est impliquée dans l'un des mécanismes de régulation de la réactivité vasculaire mis en jeu par l'hormone au sein des CMLVs. Il reste toutefois à évaluer *ex vivo* et *in vivo* l'implication propre de la phosphorylation de RhoA dans les effets vasoprotecteurs.**

**D'autre part, l'étude des partenaires de RhoA phosphorylée nous a permis de mettre en évidence, outre les protéines du cytosquelette attendues, deux protéines particulières, M-RIP et hsp70, dont l'étude de l'interaction avec RhoA pourrait nous permettre de mieux comprendre les fonctions de la phosphorylation de RhoA.**



## BIBLIOGRAPHIE

- Ackerman, G. E., & Carr, B. R. (2002). Estrogens. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 3(3), 225-230.
- Agard, C., Rolli-Derkinderen, M., Dumas-de-La-Roque, E., Rio, M., Sagan, C., Savineau, J. P., Loirand, G., *et al.* (2009). Protective role of the antidiabetic drug metformin against chronic experimental pulmonary hypertension. *British Journal of Pharmacology*, 158(5), 1285-1294. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00445.x
- Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Kaneko, T., Matsuura, Y., & Kaibuchi, K. (1999). The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32418-32424.
- Amano, M., Fukata, Y., & Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Experimental Cell Research*, 261(1), 44-51. doi:10.1006/excr.2000.5046
- Arnal, J., Fontaine, C., Billon-Galés, A., Favre, J., Laurell, H., Lenfant, F., & Gourdy, P. (2010). Estrogen receptors and endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), 1506-1512. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191221
- Bielecka-Dabrowa, A., Barylski, M., Mikhailidis, D. P., Rysz, J., & Banach, M. (2009). HSP 70 and atherosclerosis--protector or activator? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(3), 307-317. doi:10.1517/14728220902725149
- Billon-Galés, A., Fontaine, C., Filipe, C., Douin-Echinard, V., Fouque, M., Flouriot, G., Gourdy, P., *et al.* (2009). The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 2053-2058. doi:10.1073/pnas.0808742106
- Bornfeldt, K. E. (2000). Stressing Rac, Ras, and downstream heat shock protein 70. *Circulation Research*, 86(11), 1101-1103.
- Bregeon, J., Loirand, G., Pacaud, P., & Rolli-Derkinderen, M. (2009). Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 297(5), C1062-1070. doi:10.1152/ajpcell.00174.2009
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjeno, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(4), 356-370. doi:10.1002/bies.20558
- Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 18-24.
- Carpenter, K. D., & Korach, K. S. (2006). Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 361-373. doi:10.1196/annals.1365.033
- Cavalli, M., Carcano, R., & Beretta, C. (2002). Different contractile effects of alpha1- and alpha2-adrenergic agonists on horse isolated common digital artery smooth muscle ring preparations in vitro. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 46(4), 311-316.
- Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., & Shaul, P. W. (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(3), 401-406. doi:10.1172/JCI5347
- Chrissobolis, S., Budzyn, K., Marley, P. D., & Sobey, C. G. (2004). Evidence that estrogen suppresses rho-kinase function in the cerebral circulation in vivo. *Stroke; a Journal of*

- Cerebral Circulation*, 35(9), 2200-2205. doi:10.1161/01.STR.0000136951.85586.c8
- Coleman, M. L., Densham, R. M., Croft, D. R., & Olson, M. F. (2006). Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene*, 25(19), 2708-2716. doi:10.1038/sj.onc.1209322
- Davis, B. J., Xie, Z., Viollet, B., & Zou, M. (2006). Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes*, 55(2), 496-505.
- D'Eon, T. M., Rogers, N. H., Stancheva, Z. S., & Greenberg, A. S. (2008). Estradiol and the estradiol metabolite, 2-hydroxyestradiol, activate AMP-activated protein kinase in C2C12 myotubes. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(6), 1284-1288. doi:10.1038/oby.2008.50
- D'Eon, T. M., Souza, S. C., Aronovitz, M., Obin, M. S., Fried, S. K., & Greenberg, A. S. (2005). Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 35983-35991. doi:10.1074/jbc.M507339200
- DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology*, 15(7), 356-363. doi:10.1016/j.tcb.2005.05.001
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 561-570. doi:10.1172/JCI27987
- Ding, Q., Gros, R., Limbird, L. E., Chorazyczewski, J., & Feldman, R. D. (2009). Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 297(5), C1178-1187. doi:10.1152/ajpcell.00185.2009
- Duband, J. L., Gimona, M., Scatena, M., Sartore, S., & Small, J. V. (1993). Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 55(1), 1-11.
- Dubey, R. K., & Jackson, E. K. (2001). Cardiovascular protective effects of 17beta-estradiol metabolites. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 91(4), 1868-1883.
- Dubey, R. K., & Jackson, E. K. (2009). Potential vascular actions of 2-methoxyestradiol. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(8), 374-379. doi:10.1016/j.tem.2009.04.007
- Dubey, R. K., Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. (2004). Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(2), 403-409. doi:10.1124/jpet.103.058057
- Ellerbroek, S. M., Wennerberg, K., & Burridge, K. (2003). Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19023-19031. doi:10.1074/jbc.M213066200
- Fatigati, V., & Murphy, R. A. (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(23), 14383-14388.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D. J., & Nakano, T. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37385-37390.
- Fisslthaler, B., & Fleming, I. (2009). Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation Research*, 105(2), 114-127. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201590
- Föller, M., Sopjani, M., Koka, S., Gu, S., Mahmud, H., Wang, K., Floride, E., et al. (2009). Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *The FASEB*

- Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(4), 1072-1080. doi:10.1096/fj.08-121772
- Gabbiani, G., Schmid, E., Winter, S., Chaponnier, C., de Ckhasstonay, C., Vandekerckhove, J., Weber, K., *et al.* (1981). 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 United States of America*, 78(1), 298-302.
- Garcia, M. C., Ray, D. M., Lackford, B., Rubino, M., Olden, K., & Roberts, J. D. (2009). Arachidonic acid stimulates cell adhesion through a novel p38 MAPK-RhoA signaling pathway that involves heat shock protein 27. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20936-20945. doi:10.1074/jbc.M109.020271
- Gasteier, J. E., Madrid, R., Krautkrämer, E., Schröder, S., Muranyi, W., Benichou, S., & Fackler, O. T. (2003). Activation of the Rac-binding partner FHOD1 induces actin stress fibers via a ROCK-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38902-38912. doi:10.1074/jbc.M306229200
- Goirand, F., Solar, M., Athea, Y., Viollet, B., Mateo, P., Fortin, D., Leclerc, J., *et al.* (2007). Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *The Journal of Physiology*, 581(Pt 3), 1163-1171. doi:10.1113/jphysiol.2007.132589
- Gui, Y., Zheng, X., Zheng, J., & Walsh, M. P. (2008). Inhibition of rat aortic smooth muscle contraction by 2-methoxyestradiol. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(5), H1935-1942. doi:10.1152/ajpheart.00723.2008
- Guibert, C., Pacaud, P., Loirand, G., Marthan, R., & Savineau, J. P. (1996). Effect of extracellular ATP on cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in rat pulmonary artery myocytes. *The American Journal of Physiology*, 271(3 Pt 1), L450-458.
- Guilluy, C., Brégeon, J., Toumaniantz, G., Rolli-Derkinderen, M., Retailleau, K., Loufrani, L., Henrion, D., *et al.* (2010). The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nature Medicine*, 16(2), 183-190. doi:10.1038/nm.2079
- Guilluy, C., Rolli-Derkinderen, M., Loufrani, L., Bourgé, A., Henrion, D., Sabourin, L., Loirand, G., *et al.* (2008). Ste20-related kinase SLK phosphorylates Ser188 of RhoA to induce vasodilation in response to angiotensin II Type 2 receptor activation. *Circulation Research*, 102(10), 1265-1274. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164764
- Hamaguchi, T., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Koyama, M., Machida, H., Takase, K., *et al.* (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(3), 825-830. doi:10.1006/bbrc.2000.3225
- Hammes, S. R., & Levin, E. R. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocrine Reviews*, 28(7), 726-741. doi:10.1210/er.2007-0022
- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 23), 5479-5487. doi:10.1242/jcs.01540
- Hardie, D. G., Hawley, S. A., & Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *The Journal of Physiology*, 574(Pt 1), 7-15. doi:10.1113/jphysiol.2006.108944
- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., & Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters*, 546(1), 113-120.
- Horman, S., Morel, N., Vertommen, D., Hussain, N., Neumann, D., Beauloye, C., El Najjar, N., *et al.* (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18505-18512. doi:10.1074/jbc.M802053200
- Hu, W., Bellone, C. J., & Baldassare, J. J. (1999). RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *The Journal of Biological*

- Chemistry*, 274(6), 3396-3401.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., *et al.* (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9656-9666.
- Isles, C. G., Hole, D. J., Hawthorne, V. M., & Lever, A. F. (1992). Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men. *Lancet*, 339(8795), 702-706.
- Kawamata, T., Taniguchi, T., Mukai, H., Kitagawa, M., Hashimoto, T., Maeda, K., Ono, Y., *et al.* (1998). A protein kinase, PKN, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles and associated endoplasmic reticulum-derived vesicles and phosphorylates tau protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(18), 7402-7410.
- Krishna, S. B., Alfonso, L. F., Thekkumkara, T. J., Abbruscato, T. J., & Bhat, G. J. (2007). Angiotensin II induces phosphorylation of glucose-regulated protein-75 in WB rat liver cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 457(1), 16-28. doi:10.1016/j.abb.2006.10.011
- Lahm, T., Crisostomo, P. R., Markel, T. A., Wang, M., Weil, B. R., Novotny, N. M., & Meldrum, D. R. (2008). The effects of estrogen on pulmonary artery vasoreactivity and hypoxic pulmonary vasoconstriction: potential new clinical implications for an old hormone. *Critical Care Medicine*, 36(7), 2174-2183. doi:10.1097/CCM.0b013e31817d1a92
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., & Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *The EMBO Journal*, 15(3), 510-519.
- Laufs, U., & Liao, J. K. (1998). Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 24266-24271.
- Laufs, U., Marra, D., Node, K., & Liao, J. K. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *The Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21926-21931.
- Lee, H., Seong, Y., Lee, W., & Kim, I. (2005). 17beta-Estradiol inhibits calcium-dependent, but not calcium-independent, contraction in isolated rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 371(2), 152-157. doi:10.1007/s00210-004-1017-3
- Levin, E. R. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(10), 477-482. doi:10.1016/j.tem.2009.06.009
- Li, C., & Keaney, J. F. (2010). AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(2), 111-115. doi:10.1016/j.coph.2009.11.009
- Loirand, G., Guérin, P., & Pacaud, P. (2006a). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circulation Research*, 98(3), 322-334. doi:10.1161/01.RES.0000201960.04223.3c
- Loirand, G., Guilluy, C., & Pacaud, P. (2006b). Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16(6), 199-204. doi:10.1016/j.tcm.2006.03.010
- Madaule, P., & Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell*, 41(1), 31-40.
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T., *et al.* (1998). Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, 394(6692), 491-494. doi:10.1038/28873
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., *et*

- al. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5429), 895-898.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., & Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Molecular Cell*, 4(5), 793-803.
- Majithiya, J. B., & Balaraman, R. (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 78(22), 2615-2624. doi:10.1016/j.lfs.2005.10.020
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S., et al. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of Cell Biology*, 140(3), 647-657.
- Mendelsohn, M. E., & Karas, R. H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*, 340(23), 1801-1811.
- Mendelsohn, M. E., & Karas, R. H. (2005). Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1583-1587. doi:10.1126/science.1112062
- Mermall, V., Post, P. L., & Mooseker, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5350), 527-533.
- Miller, V. M., & Duckles, S. P. (2008). Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacological Reviews*, 60(2), 210-241. doi:10.1124/pr.107.08002
- Mitchell, J. J., Reynolds, S. E., Leslie, K. O., Low, R. B., & Woodcock-Mitchell, J. (1990). Smooth muscle cell markers in developing rat lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 3(6), 515-523.
- Moriarty, K., Kim, K. H., & Bender, J. R. (2006). Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology*, 147(12), 5557-5563. doi:10.1210/en.2006-0729
- Nagata, D., & Hirata, Y. (2010). The role of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 33(1), 22-28. doi:10.1038/hr.2009.187
- Nusser, N., Gosmanova, E., Makarova, N., Fujiwara, Y., Yang, L., Guo, F., Luo, Y., et al. (2006). Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cellular Signalling*, 18(5), 704-714. doi:10.1016/j.cellsig.2005.06.010
- Oishi, H., Schuster, A., Lamboley, M., Stergiopoulos, N., Meister, J., & Bény, J. (2002). Role of membrane potential in vasomotion of isolated pressurized rat arteries. *Life Sciences*, 71(19), 2239-2248.
- Raftogianis, R., Creveling, C., Weinshilboum, R., & Weisz, J. (2000). Estrogen metabolism by conjugation. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (27), 113-124.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., et al. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotekin in the rho-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13556-13560.
- Riddick, N., Ohtani, K., & Surks, H. K. (2008). Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(4), 1158-1170. doi:10.1002/jcb.21488
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B., & Ridley, A. J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 23(12), 4219-4229.
- Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D.,

- Loirand, G., *et al.* (2005). Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 96(11), 1152-1160. doi:10.1161/01.RES.0000170084.88780.ea
- Rolli-Derkinderen, M., Toumaniantz, G., Pacaud, P., & Loirand, G. (2010). RhoA Phosphorylation Induces Rac1 Release from GDI{alpha} and Stimulation of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology*. doi:10.1128/MCB.00381-10
- Safe, S., Kim, K., & Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(5), 263-275. doi:10.1677/JME-08-0103
- Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., *et al.* (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21722-21729. doi:10.1074/jbc.M000753200
- Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G., & Pacaud, P. (2003). RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9472-9480. doi:10.1074/jbc.M212776200
- Savineau, J., & Marthan, R. (2000). Cytosolic Calcium Oscillations in Smooth Muscle Cells. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 15, 50-55.
- Sawada, N., Itoh, H., Yamashita, J., Doi, K., Inoue, M., Masatsugu, K., Fukunaga, Y., *et al.* (2001). cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), 798-805. doi:10.1006/bbrc.2000.4194
- Schoentaube, J., Olling, A., Tatge, H., Just, I., & Gerhard, R. (2009). Serine-71 phosphorylation of Rac1/Cdc42 diminishes the pathogenic effect of Clostridium difficile toxin A. *Cellular Microbiology*, 11(12), 1816-1826. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01373.x
- Schulz, E., Anter, E., Zou, M., & Keaney, J. F. (2005). Estradiol-mediated endothelial nitric oxide synthase association with heat shock protein 90 requires adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation*, 111(25), 3473-3480. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.546812
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., & Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, 3(4), 346-352. doi:10.1038/35070019
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., & Bréard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 465-471. doi:10.1084/jem.20031877
- Seko, T., Ito, M., Kureishi, Y., Okamoto, R., Moriki, N., Onishi, K., Isaka, N., *et al.* (2003). Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circulation Research*, 92(4), 411-418. doi:10.1161/01.RES.0000059987.90200.44
- Sellers, J. R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1496(1), 3-22.
- Shibasaki, Y., Ishihara, H., Kizuki, N., Asano, T., Oka, Y., & Yazaki, Y. (1997). Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7578-7581.

- Shifren, J. L., & Schiff, I. (2010). Role of hormone therapy in the management of menopause. *Obstetrics and Gynecology*, *115*(4), 839-855. doi:10.1097/AOG.0b013e3181d41191
- Shirao, S., Kashiwagi, S., Sato, M., Miwa, S., Nakao, F., Kurokawa, T., Todoroki-Ikeda, N., *et al.* (2002). Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circulation Research*, *91*(2), 112-119.
- Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Caruso, A., Varone, G., & Genazzani, A. R. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids*, *69*(8-9), 537-542. doi:10.1016/j.steroids.2004.05.009
- Simoncini, T., Mannella, P., & Genazzani, A. R. (2006). Rapid estrogen actions in the cardiovascular system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1089*, 424-430. doi:10.1196/annals.1386.001
- Smiley, D. A., & Khalil, R. A. (2009). Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(15), 1863-1887.
- Soliman, H., Craig, G. P., Nagareddy, P., Yuen, V. G., Lin, G., Kumar, U., McNeill, J. H., *et al.* (2008). Role of inducible nitric oxide synthase in induction of RhoA expression in hearts from diabetic rats. *Cardiovascular Research*, *79*(2), 322-330. doi:10.1093/cvr/cvn095
- Stossel, T. P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science (New York, N.Y.)*, *260*(5111), 1086-1094.
- Su, C., Deaton, R. A., Iglewsky, M. A., Valencia, T. G., & Grant, S. R. (2007). PKN activation via transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) receptor signaling delays G2/M phase transition in vascular smooth muscle cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(6), 739-749.
- Tolias, K. F., Cantley, L. C., & Carpenter, C. L. (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(30), 17656-17659.
- Trinkle-Mulcahy, L., Ichikawa, K., Hartshorne, D. J., Siegman, M. J., & Butler, T. M. (1995). Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with a decreased activity of myosin light chain phosphatase in alpha-toxin-permeabilized smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(31), 18191-18194.
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5545), 1299-1304. doi:10.1126/science.1062023
- Wang, S., Dale, G. L., Song, P., Viollet, B., & Zou, M. (2010). AMPK alpha 1 deletion shortens erythrocyte lifespan in mice: role of oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M110.102467
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R. K., Somlyo, A. V., *et al.* (1997). Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nature Structural Biology*, *4*(9), 699-703.
- Wong, A. K. F., Howie, J., Petrie, J. R., & Lang, C. C. (2009). AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *116*(8), 607-620. doi:10.1042/CS20080066
- Xing, D., Nozell, S., Chen, Y., Hage, F., & Oparil, S. (2009). Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(3), 289-295. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182279
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E. D., Ichihara, S., & Inagami, T. (2000). Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, *35*(1 Pt 2), 313-318.
- Young, L. H., Li, J., Baron, S. J., & Russell, R. R. (2005). AMP-activated protein kinase: a

- key stress signaling pathway in the heart. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(3), 110-118. doi:10.1016/j.tcm.2005.04.005
- Zhang, B. B., Zhou, G., & Li, C. (2009). AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*, 9(5), 407-416. doi:10.1016/j.cmet.2009.03.012
- Zheng, Y., Im, C., & Seo, J. (2006). Inhibitory effect of Hsp70 on angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(5), 509-518.



# ANNEXE 1



# AMPK $\alpha$ 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol



Marion Gayard<sup>1,2</sup>, Christophe Guilluy<sup>1,2</sup>, Anthony Rousselet<sup>1,2</sup>, Benoit Violette<sup>1,2</sup>, Gervaise Loirand<sup>1,2,3</sup>, Pierre Pacaud<sup>1,2</sup> and Malvynne Rolli-Derkinderen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR915, l'Institut du thorax, Nantes, France | <sup>2</sup> Université de Nantes, France | <sup>3</sup> CHU Nantes, Nantes, France | <sup>4</sup> Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France | <sup>5</sup> Inserm U367, Paris, France

## Background

AMP-activated protein kinase (AMPK) is an ubiquitous serine/threonine protein kinase activated by pathological stress, such as oxidative damage, ischemic shock, hypoxia and glucose deprivation, as well as by physiological stimuli such as exercise and muscle contraction, and by hormones including leptin, adiponectin and estradiol.

AMPK function in vessels is poorly investigated.



AMPK has vasodilatory effects independent of endothelium (Guilluy et al. J Physiol 2007).

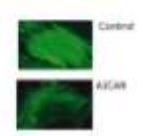
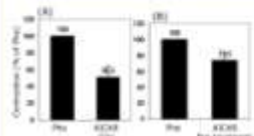
Evidence accumulates regarding the role of the small G protein RhoA in vascular smooth muscle cell (VSMC) pathophysiology.

## Preliminary data

More than vasodilatory effects independent of endothelium, AMPK activation limits vasoconstriction and inhibits actin stress fibers.

AMPK activator (ACICAR 100nM) treatment reduces vasodilation of rat aortic rings pre-contracted with phenylephrin (PE) (A) or inhibits contraction induced by PE when used as pre-treatment (B). Both analyses were done in presence of L-NAMO (2.10<sup>-6</sup>M).

Rhodamine staining of actin stress fibers in rat aortic VSMC cultured in presence of serum before AMPK-activator (ACICAR 100nM, 15h) treatment.



## Questions

Role of AMPK in vascular smooth muscle cells (VSMC)?

Effect of AMPK activation on RhoA-Rock pathway?

## AMPK and RhoA

**AMPK activation inhibits RhoA-Rock pathway**

(A) Western blot analysis of RhoA phosphorylation (Phospho-MYPT) and total RhoA in VSMC treated with AMPK-activator (ACICAR 100nM) or vehicle. (B) Western blot analysis of RhoA phosphorylation (Phospho-Ser) and total RhoA in VSMC treated with AMPK-activator (ACICAR 100nM) or vehicle.

RhoA-Rock pathway activation was measured by western blot using phospho-MYPT antibodies. VSMC were transfected with mock (-), a dominant negative (DN) or a constitutively active form of AMPK (CA), or treated with AMPK-activator (ACICAR 100nM) (B).

RhoA phosphorylation was measured by western blot using anti-phospho-Serine (phospho-Ser) antibodies on RhoA immunoprecipitation (RhoA IP) from lysates of VSMC treated with AMPK-activator (ACICAR 100nM).

**AMPK directly phosphorylates RhoA on Ser188**

Western blot analysis of RhoA phosphorylation (Phospho-Ser) and total RhoA in VSMC treated with AMPK-activator (ACICAR 100nM) or vehicle. In vitro kinase assays using control peptide (SAM2), wild type (RhoA-WT) or phosphoresistant RhoA (RhoA-S188A) as substrates for recombinant AMPK.

RhoA sequence analysis shows homology with the consensus sequence of AMPK phosphorylation.

## AMPK, estradiol and RhoA

**E2 activates AMPK and inhibits RhoA-Rock pathway activation**

Western blot analysis of AMPK activation (Phospho-ACC) and RhoA-Rock pathway activation (Phospho-MYPT) in VSMC treated with estradiol (10<sup>-6</sup>M) for 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 hours. RhoA phosphorylation (Phospho-Ser) was measured by western blot using anti-phospho-Serine (phospho-Ser) antibodies on RhoA immunoprecipitation (RhoA IP) from lysates of VSMC treated with estradiol (10<sup>-6</sup>M).

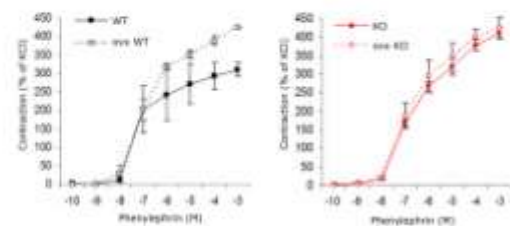
**E2 induces RhoA phosphorylation through AMPK**

Western blot analysis of AMPK activation (Phospho-ACC) and RhoA phosphorylation (Phospho-Ser) in VSMC treated with estradiol (10<sup>-6</sup>M) for 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 hours. AMPK activation was inhibited by compound C (CC) and RhoA phosphorylation was inhibited by Y27632.

## AMPK mediates vasoprotective effect of estradiol

Phenylephrin (PE) contraction of aortic rings from wild type (WT) and AMPK $\alpha$ 1 knock-out mice (KO), vasodilated (CC) or not.

Graphs showing contraction (% of PE) vs Phenylephrin (PE) concentration for WT and KO mice, with and without compound C (CC).



## Conclusion

AMPK is a new kinase for RhoA.

Estradiol induces RhoA-phosphorylation and vasoprotective effect through AMPK.

These results could in part explain the effects of the estrogen depletion observed on women cardiovascular system after menopause.

## ANNEXE 2

# AMPK $\alpha$ 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol

Marion Gayard<sup>1</sup>, Christophe Guilluy<sup>1</sup>, Anthony Rousselle<sup>1</sup>, Benoit Viollet<sup>2,3</sup>, Daniel Henrion<sup>4</sup>, Gervaise Loirand<sup>1,5,6\*</sup> and Malvyne Rolli-Derkinderen<sup>1\*</sup>

*INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes, F-44000 France,<sup>1</sup> Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France,<sup>2</sup> Inserm, U567, Paris, France,<sup>3</sup> CNRS UMR 6214, Angers, France,<sup>4</sup> Université de Nantes,<sup>5</sup> and CHU Nantes,<sup>6</sup> Nantes, F-44000 France*

Word count for the Abstract: 219 words

Character count for the Abstract, Introduction, Results, Discussion, and Figure Legend sections: 29085 characters

Running title: RhoA is a new substrate for the AMPK

\*Corresponding authors: Mailing address for Malvyne Rolli-Derkinderen: INSERM UMR915, Institut du Thorax, IRTUN, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes cedex 7, France Phone: 33 6 62 84 74 82 Fax: 33 2 28 08 01 30. E-mail: [malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr](mailto:malvyne.derkinderen@univ-nantes.fr). Mailing address for Gervaise Loirand: INSERM UMR915, Institut du Thorax, IRTUN, 8 quai Moncousu, BP70721, 44007 Nantes cedex 7, France Phone: 33 2 28 08 01 16 Fax: 33 2 28 08 01 30. E-mail: [gervaise.loirand@univ-nantes.fr](mailto:gervaise.loirand@univ-nantes.fr).

## ABSTRACT

As evidence accumulate regarding the role of the small G protein RhoA in vascular pathophysiology, and the benefit of RhoA-Rock pathway inhibition, we are looking for new pathway leading to this inhibition and in particular RhoA phosphorylation. As the energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK) had unexplain vasodilatatory effect, herein we have tested whether the AMPK could target RhoA-Rock pathway in vascular smooth muscle cells (VSMC). We have shown that the inhibition of RhoA-Rock pathway by AMPK activation resulted from the direct phosphorylation of the serine 188 of RhoA by AMPK. *In vitro*, 17-Estradiol (E2) activated AMPK and thereby inhibited the RhoA-Rock pathway in a time (5 min to 24 h)- and concentration ( $10^{-10}$  to  $10^{-6}$ M)-dependent manner. *Ex vivo*, we observed in aortic rings that ovariectomy led to increase the amplitude of phenylephrine- or serotonin-induced contractions in control wild-type mice but not in AMPK $\alpha$ 1- knockout mice that are already hypersensitive. *In vivo*, hypertension development is accelerated in female mice lacking the AMPK $\alpha$ 1, becoming closed to the one observed in male mice. These functional effects were correlated with a reduced level of RhoA phosphorylation in the aorta of ovariectomized mice and AMPK $\alpha$ 1 knockout mice. Our work thus defines vascular smooth muscle AMPK as (i) a new kinase for RhoA and (ii) a new mediator of the vasoprotective effects of estrogen.

**Key Words:** AMPK ; estrogen ; menopause

## INTRODUCTION

Rho proteins are recognized as major regulator of the actin cytoskeleton (Hall, 1998). In addition, a large body of evidence has now been obtained regarding the important roles of Rho proteins in the regulation of major cellular functions such as membrane trafficking, phospholipid metabolism, cell cycle progression, cell transformation, apoptosis and transcriptional activation (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hall, 1998; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). In the vasculature, RhoA has been shown to play a major role in vascular processes such as smooth muscle cell contraction, proliferation and differentiation, endothelial permeability, platelet activation, and leukocyte migration (Mack et al., 2001; van Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2001). The Rho proteins are identified as tightly regulated molecular switches that cycle between an active, GTP-bound form and an inactive GDP-bound form (BurrIDGE and Wennerberg, 2004; Etienne-Manneville and Hall, 2002). In the inactive GDP-bound form, RhoA is locked in the cytosol by guanine dissociation inhibitors (GDI) (Leonard et al., 1992). The guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) catalyze the exchange of GDP for GTP to activate RhoA (Rossman et al., 2005; Seasholtz et al., 1999). In the active GTP-bound form, RhoA translocates to plasma membrane where it interacts with effectors to transduce the signal downstream. For example, the active, GTP-bound form triggers activation of its effector Rho kinase, which phosphorylates the myosin phosphatase target subunit (MYPT) and thereby inhibits the activity of myosin light chain phosphatase. This inhibition results in Ca<sup>2+</sup> sensitization of contractile proteins, which underlies the tonic component of vascular smooth muscle contraction (Somlyo and Somlyo, 2003). Activation is then turned off by GTPase-activating proteins (RhoGAP) that induce the hydrolysis of GTP to GDP.

In addition to this regulation, recent reports have proposed that phosphorylation/dephosphorylation cycle also controls Rho protein activity. In most cases, phosphorylation occurs on a serine residue located in the C-terminal domain of Rho proteins and modifies their cellular location. Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) has been shown to phosphorylate Ser188 of RhoA thereby inducing their re-localization in the cytosol (Lang et al., 1996; Quilliam et al., 1991). *In vitro* experiments have evidenced that RhoA phosphorylation on Ser188 increases the ability of RhoGDI to extract RhoA from membrane (Forget et al., 2002; Lang et al., 1996). Therefore, phosphorylation has been suggested to be a mechanism of regulation of RhoA activity that is independent of GDP-GTP cycling (Ellerbroek et al., 2003). Research from our laboratory has shown that cGMP-dependent protein kinase (PKG) also phosphorylates RhoA on Ser188 and inhibits RhoA-Rho-kinase pathway, thereby contributing to the vasodilator effect of nitric oxide (NO) (Sauzeau et al., 2000). PKG-mediated RhoA phosphorylation is also responsible, at least in part, for the inhibitory effect of PKG signalling on actin cytoskeleton organization and serum-response factor-dependent transcription (Begum et al., 2002; Gudi et al., 2002; Sandu et al., 2001; Sauzeau et al., 2000). Furthermore, we have shown that PKA and PKG are not the only kinases able to phosphorylate RhoA on Ser188. Indeed, stimulation of angiotensin II (Ang II) type 2 receptor (AT(2)R) in VSMC induces Ser188 phosphorylation of RhoA by the Ser/Thr kinase Ste20-related kinase SLK, which contributes to the vasodilatory effect of AT(2)R (Guilluy et al., 2008). In addition, we have showed that phosphorylation of RhoA on Ser188 increases the stability of the protein by inhibiting its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway (Rolli-Derkinderen et al., 2005). Consistently, stimulation of RhoA phosphorylation in VSCM leads to the accumulation of GTP-bound RhoA in the cytoplasm of the cell (Rolli-Derkinderen et al., 2005) and activation of Rac-1 to induce VSMC migration (Rolli-Derkinderen M., 2010).

Numerous studies have demonstrated the participation of the RhoA/Rho kinase signaling pathway in several vascular pathologies, including hypertension, coronary artery spasm, effort angina, atherosclerosis, and restenosis (Budzyn et al., 2006; Guilluy et al., 2010; Loirand et al., 2006). In the same manner the use of RhoA/Rho kinase inhibitors reverse or delay vascular pathology development and could have beneficial effects for additional indications (Oka et al., 2008; Olson, 2008). Until now the functions of phosphorylated RhoA at least mimicks RhoA-Rock inhibition, and the loss of RhoA phosphorylation is associated with diabetes (Soliman et al., 2008), pointing out the potential beneficial interest for RhoA phosphorylation inducers.

Goirand et al described that the activation of the energy sensor AMP-activated protein Kinase (AMPK) $\alpha$ 1, but not AMPK $\alpha$ 2, was able to induce aortic relaxation in mice, in an endothelium- and eNOS-independent manner (Goirand et al., 2007). The aim of the present study was to determine whether RhoA phosphorylation was a mediator of AMPK activation in vascular smooth muscle cells (VSMC). In a second time, we wanted to determine the potential beneficial effects of AMPK-RhoA pathway *in vivo*.



## MATERIALS AND METHODS

**Cell Culture, transfections and treatments.** Rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) were isolated by enzymatic dissociation as previously described (Guibert et al., 1996). VSMC at passage 2 to 4 were used for this study, cultured in DMEM containing 10% of fetal calf serum and treated with AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside, 3 mM for the indicated time), metformin (1,1-Dimethylbiguanide, Hydrochloride, 4 mM), cGMP dependent protein kinase activator (8-pCPT-cGMP, 100  $\mu$ M) or 17-b-estradiol (10-9M) for the indicated times. Estrogen receptor antagonist (ICI 182, 780 1 $\mu$ M), protein kinase A inhibitor H89 (N-[2-((*p*-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, 10 $\mu$ M) or AMPK inhibitor (compound C, 10 $\mu$ M) were performed 45 min before other treatments. For transfection, VSMC were plated at 70-80% confluence for cDNA transfection using the Nucleofector (LONZA/Amaza) according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $2 \cdot 10^6$  cells were electroporated with 4  $\mu$ g of plasmid using the D33 program and replated in DMEM medium containing 10% FCS for 24 hours. Twenty four hour post-transfection, culture medium is replace and VSMC are treated or not with 17-b-estradiol (10-9M) for one hour. cDNA coding for the constitutively active form of AMPK (CA) or the dominant inactive form of AMPK (DN) are gifts from Benoit Viollet. cDNA encoding for RhoA mutants were previously described (Rolli-Derkinderen et al., 2005). They are fused to an HA-tag thereby expression of RhoA-mutants were analyzed using anti-HA antibody (HA)

**Actin stress fiber staining.** After treatments, cells were then fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.5% Triton X-100, and then rinsed in phosphate-buffered saline (PBS). To visualise actin stress fibers, polymerized F-actin staining was done with FITC-conjugated phalloidin (5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), then washed in PBS. Coverslips were mounted

on a glass slide and examined with a fluorescence microscope (Eclipse E-600, Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

**Western Blot Analysis.** After treatment, cells were harvested and homogenized in NETF lysis buffer containing NaCl 100mM, EGTA 2mM, Tris-HCl 50mM, NaF 50 mM, Nonidet P-40 1%, orthovanadate 2 mM, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), and serine-threonine phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Nuclei and unlysed cells were removed by centrifugation at 10,000g for 10 min at 4°C. Proteins were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes that were incubated with specific antibodies. Signals from immunoreactive bands were detected by ECLplus (General Electric) and quantified using QuantityOne (BioRad). Equal loading was checked by reprobing the membrane with monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody ( $\beta$ -actin) (Sigma-Aldrich).

**AMPK kinase assay.** Direct AMPK activity was measured using human recombinant AMPK (MERCK) and  $[\text{32P}]$  incorporated into SAMS peptide substrate (HMRSAMSGHLVKRR) (MERCK) or recombinant Wild Type- (WT-) or phosphoresistant- (S188A-) RhoA for 30min at 30°C using a final concentration of 50  $\mu$ M ATP according to the manufacturer instructions (MERCK).

**Animals.** After bilateral ovariectomy, wild type or AMPK $\alpha$ 1 deficient female mice (10 to 20 weeks old) provided by Benoit Viollet were daily treated with 17- $\beta$ -estradiol (subcutaneous, 0.1mg/kg/day) or placebo. After 7 to 10 days, they were killed by cervical dislocation. Their spleens were weight to control the mice genotype (WT spleen 103.5mg $\pm$ 45.39 versus  $\alpha$ 1 KO spleen 252mg $\pm$ 60.01) and their aorta used for Western Blot or tension analysis. To induce hypertension, L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine-méthyl ester ; 1mg/ml) was dissolved in drinking water. After 14 days, they were killed by cervical dislocation and their aorta used for Western Blot or tension analysis.

**Tension Measurement.** Isometric tension of arterial rings of thoracic aorta was measured as previously described (Guilluy et al., 2010) To avoid the already described effect of AMPK activation on nitric oxide (NO) production, we always worked in presence of NO synthase inhibitor (L-NNNA  $2.10^{-4}$ M), except for the Fig5B. L-NNA inhibition was controlled by the absence of carbachol ( $10^{-5}$ M)-induced vasodilatation on mice aortic rings precontracted with phenylephrine (data not shown).

**Chemicals and Drugs.** Mouse monoclonal anti-RhoA antibody (26C4 ; sc-418), rabbit anti-phospho-MYPT (Thr696; sc-17556) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA). Rabbit anti-phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) ((p)-ACC) was purchased from Cell Signaling (TEBU Bio). Mouse monoclonal anti-phosphoserine was purchased from (ZYMED). Mouse monoclonal anti-HA (HA.11) was purchased from Berkely Antibody Co. (BabCO, Richmond, CA, USA). 8-pCPT-cGMP was purchased from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany). 17- $\beta$ -estradiol and ICI 182, 780 were purchased from TOCRIS (Bioscience (Bristol). Compound C, AICAR, Metformin and H89 were purchased from Calbiochem (MERCK biochemicals). All other reagents were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

**Statistics.** All results are expressed as the mean $\pm$ SD of sample size n. Statistical analyses were performed with 2-ways ANOVA. A value of  $p < 0.05$  or less was considered to be statistically significant and is specified for each experiment in the figure legend.

## RESULTS

**AMPK activation induces vasorelaxation and limits vasoconstriction independently of NO.** To evaluate the effect of AMPK on VSMC function, we first have used a pharmacological approach consisting in testing the AICAR and metformin activator of AMPK on vasoreactivity. To avoid the already described effect of AMPK activation on nitric oxide (NO) production, we always worked in presence of NO synthase inhibitor (L-NNA  $2.10^{-4}$ M). L-NNA inhibition was controlled by the absence of carbachol ( $10^{-5}$ M)-induced vasodilatation on mice aortic rings precontracted with phenylephrine (data not shown). AICAR and metformin induced a significant vasodilation of mice aortic rings precontracted with phenylephrine (Fig1A). When used a pre-treatment, AICAR as metformin significantly reduced the maximal contraction induced by phenylephrine (Fig1B). This shown that in addition to a vasodilatory effect, AMPK activation could limit contraction.

**AMPK activation inhibits actin stress fibers and RhoA-Rock pathway.** RhoA-Rock pathway activation is characterised by an increased in actin stress fibers formation and the phosphorylation of one target of Rock, the MYPT. AICAR induces a loss of actin stress fibers comparable to the one induced by protein kinase G activator 8pCPTcGMP (Fig1C). AICAR as well as metformin induced the dephosphorylation of MYPT (Fig1D) in concomitance with the phosphorylation of RhoA (Fig1F). These effects are similar to the one obtained by expressing a constitutively active (CA) form of AMPK in VSMC (Fig1E and G). They are opposed to the effects of a dominant negative (DN) expression that increased MYPT phosphorylation and decreased the phosphorylation of RhoA (Fig1E and G). These results shown that AMPK activation inhibits actin stress fibers formation and RhoA-Rock pathway but increases RhoA phosphorylation

**AMPK directly phosphorylates RhoA on Ser188.** To foresee the possibility that the AMPK directly phosphorylate RhoA on its serine residu 188, we have first analysed the affected sequence. Alignment of the *human*, *rattus norvegicus* and *mus musculus* sequences of RhoA to the consensus AMPK phosphorylation sequence has shown that the K situated three amino-acid before, and the L located 5 amino-acid after the Ser188 correspond to the consensus sequence. Only the G situated one amino-acid after the Ser188 correspond to the sequence of the SAMS peptide, used as a positive control for AMPK kinase assay (Fig 2A). Prediction of specific phosphorylation site using <http://ppsp.biocuckoo.org/index.php> has revealed that the score concerning the phosphorylation of the RhoA Ser 188 by the AMPK was comparable to the one obtain with the PKG (Fig2B), kinase well known to phosphorylate RhoA (Sauzeau et al., 2000). *In vitro* kinase assays, have shown that WT-RhoA can by phosphorylated by the AMPK to the same extend that the SAMS control peptide. In contrast, RhoA mutant laking the Ser188 phosphorylation site, the S188A-RhoA mutant, did not shown any phosphate incorporation, as did the GDI that is not an AMPK substrate (Fig 2C). All together, these results show that *in vitro*, the AMPK is a new kinase for the Ser 188 of RhoA.

**E2 activates AMPK and inhibits RhoA-Rock pathway activation.** In order to identify a physiological context in which the AMPK could inhibit the RhoA-Rock pathway through RhoA phosphorylation, we have analysed the effect of 17- $\beta$ -estradiol (E2) on VSMC. Indeed, the E2 seems to be a good candidate because it has vasoprotective effects which mechanisms are not explain at the level of the smooth muscle. More than this, D'Eon et al described that E2 can activate the AMPK in myotubes (D'Eon et al., 2008). We then have measured the level of AMPK target ACC in VSMC stimulated with 10<sup>-9</sup>M E2 for different times. E2 induced a time-dependent phosphorylation of ACC (Fig 3A), showing that AMPK can indeed be activated by E2 in VSMC. Concerning RhoA-Rock pathway, we have observed that E2 can induce a time- (Fig 3B and 3C) and dose- (Fig 3 D and E) dependent phosphorylation of

RhoA and a dephosphorylation of MYPT. Analysis of RhoA-Rock pathway in VSMC expressing wild-type (WT-RhoA) or phosphoresistant mutant (S188A-RhoA) has shown that E2 can neither induce RhoA phosphorylation nor MYPT dephosphorylation when the phosphoresistant mutant was expressed (Fig 3F). This shows that E2-induced RhoA phosphorylation on Ser188 is responsible for RhoA-Rock pathway inhibition. The phosphorylation of ACC induced by E2 was not affected by RhoA mutant expression, demonstrating that AMPK pathway activation by E2 is independent of RhoA phosphorylation (Fig 3F).

**E2 induces RhoA phosphorylation through AMPK.** To prove that E2 induces RhoA phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition through AMPK in VSMC, we pre-treated the cells with different inhibitors. The Compound C AMPK inhibitor prevented the basal but also the E2-induced RhoA phosphorylation (Fig 4A) and ACC phosphorylation (Fig 4B). It increased the basal MYPT phosphorylation and inhibited the dephosphorylation induced by E2 (Fig 4B). These results demonstrated that in VSMC, RhoA phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition are induced by E2 through AMPK activation. This shows also that the AMPK is basally activated in our cells. To consider an implication of the protein kinase A (PKA), described as a RhoA kinase (Lang et al., 1996) that could be activated by E2 (Ng et al., 2008), we have pre-treated the cells with PKA inhibitor H89. It did not show any effect on RhoA phosphorylation or on RhoA-Rock or AMPK pathways (Fig 4A and 4B) demonstrating no major implication of PKA in this signalling.

**E2 induces RhoA phosphorylation through estrogen receptor (ER).** To analyse if E2 induces RhoA phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition through ER in VSMC, we pre-treated the cells with ICI,182780 antagonist of ER. It prevented the E2-induced RhoA phosphorylation (Fig 4A) and ACC phosphorylation (Fig 4B). More than this it inhibited the MYPT dephosphorylation induced by E2 (Fig 4B). These results demonstrated that RhoA

phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition are induced by E2 through ER in VSMC.

**Estradiol limits vasoconstriction and RhoA phosphorylation through activation of AMPK $\alpha$ 1.** To analyse the vascular consequences of the newly describes E2-AMPK-RhoA-Rock signalling pathway in smooth muscle, we have tested the vasoreactivity of aorta rings from wild-type or  $\alpha$ 1 knock-out female mice, ovariectomised or not and daily supplemented with E2 or not. The knock-outing or the ovariectomy did not significantly change the systolic pressure of female mice (Fig 5A). In contrast, WT male mice had significantly higher blood pressure, but again the systolic pressure of the KO male mice did not significantly differ from the one measured in the WT male mice (Fig 5A). The contraction induced by 60mM of KCl did not differ significantly between WT and KO aortic rings (Fig 5B). The vasorelaxation induced by E2 was significantly inhibited by the L-NNA, but we were not able to detect any differences between WT or KO mice (Fig 5C). In contrast, ovariectomy significantly increased the response to phenylephrine. This increase was inhibited by the daily supplementation with E2 (Fig 5D). In contrast ovariectomy or E2 supplementation have had no effect on KO aortic ring responses to phenylephrine, that were comparable to the responses of ovariectomised WT aortic rings (Fig 5D). Same results were observed with serotonin (5HT) (Fig 5E). Measurement of RhoA phosphorylation in aorta from KO animals have shown that RhoA phosphorylation was diminished in aortas from KO animals (Fig 5F). The decrease of RhoA phosphorylation detected in aorta from WT OVX animals was not observed in aorta from KO animals. All together, these results suggest that AMPK $\alpha$ 1 could limit vasocontraction by inducing RhoA phosphorylation.

**Female hypertension development is delayed due to AMPK $\alpha$ 1.** To consider a physiological consequence of the role of AMPK $\alpha$ 1 on the vasculatory system, we have followed the development of hypertension induced by L-NAME in WT or AMPK $\alpha$ 1-KO

mices, female or male. WT female mice presented a significant increase in systolic blood pressure after 14 days of L-LAME (Fig 6A). In contrast, KO female, as well as WT or KO male, have shown a significant increase in blood pressure after only 2 days of L-NAME (Fig 6A). These results show that due to AMPK $\alpha$ 1, female are transiently protected from L-NAME induced-hypertension. Measurement of ACC and RhoA phosphorylation revealed that the WT male as the KO female have a significant lower level of phosphorylated ACC as well as phosphorylated RhoA compared to the WT female (Fig 6B). This demonstrated that AMPK $\alpha$ 1-RhoA pathway is constitutively more activated in female than in male mice, that could be responsible for the vasoprotective effect of estrogens.



## DISCUSSION

The AMPK is an ubiquitous heterotrimeric serine/threonine protein kinase consisting of the catalytic subunit ( $\alpha$ ) and two regulatory subunits ( $\beta$  and  $\gamma$ ) that exist as multiple isoforms and splice variants, resulting in the generation of twelve possible heterotrimeric combinations. AMPK is activated by pathological stimuli, such as oxidative damage, osmotic shock, hypoxia and glucose deprivation, as well as by physiological stimuli such as exercise and muscle contraction, and by hormones including leptin and adiponectin (Hardie, 2003). AMPK is activated in response to decreased cellular energy charge (increased in AMP/ATP ratio) and is involved in regulating carbohydrate and lipid metabolism (Hardie, 2007a, b; Sambandam and Lopaschuk, 2003). Although there is a strong link between the activity of the AMPK and the metabolic control in skeletal muscle or heart, the role of the AMPK activity in other organs is less studied. Nevertheless concerning the vasculature, AMPK can be regulated by hypoxia as well as fluid shear stress and has been implicated in the regulation of fatty acid oxidation, small G protein activity and nitric oxide production as well as inflammation in endothelial cells (Fisslthaler and Fleming, 2009). Concerning the smooth muscle, AICAR have been shown to inhibit VSMC proliferation and neointimal formation (Igata et al., 2005; Nagata et al., 2004). Two other works described that AICAR or metformin can induce vasorelaxation independently of the endothelium (Goirand et al., 2007; Majithiya and Balaraman, 2006) and even reduce blood pressure of diabetic rats (Majithiya and Balaraman, 2006). Demonstrating that AMPK $\alpha$ 1 can limit contraction of smooth muscle, our work represents another evidence indicating that the activation of AMPK may help to prevent the vascular complications associated with the metabolic syndrome (Fisslthaler and Fleming, 2009).

The only mechanism that could explain the effect of AMPK activation on VSMC is the phosphorylation and thereby desensitization of the myosin light chain kinase (Horman et al., 2008). It gets along with the effect that we are describing concerning the inhibitory action of the AMPK on the calcium-sensitization pathway involving RhoA. AMPK mediates its action through numerous targets, including transcription factors or direct phosphorylation and thereby inhibition of the 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase, and of the acetyl coenzyme A carboxylase (ACC). The inhibitory effect of AMPK on HMG CoA reductase, responsible for Rho protein isoprenylation, lets suspected that AMPK activation could lead to Rho protein inhibition, but Kanellis et al. have shown that AICAR and phenformin activators of AMPK did not modify RhoA, Rac, or Cdc42 activation (Kanellis et al., 2006). Levine et al. have even shown that AMPK can activate Rac1 in endothelial cells (Levine et al., 2007). To our knowledge, there is only two works showing an effect of pharmacological activation of AMPK on RhoA-Rock pathway. Kanazawa et al. have shown that AICAR can induce an inhibition of Rock activity in osteoblastic MC3T3 cells (Kanazawa et al., 2009), and we have shown that metformin can inhibit MYPT phosphorylation in pulmonary smooth muscle (Agard et al., 2009). Our present work is an evidence of the inhibitory effect of the AMPK itself on RhoA-Rock pathway and shows its reality in different cell type such as smooth muscle, or even fibroblasts (data not shown). In addition we have described the mechanism responsible for RhoA-Rock inhibition in response to AMPK activation: the phosphorylation of the Ser 188. Thereby we define a new kinase for RhoA, and new potential functions for the phosphorylated RhoA. No detectable change in systolic blood pressure in AMPK $\alpha$ 1-KO or ovariectomised animals, while RhoA phosphorylation was modified, implies that RhoA phosphorylation has not a dominant effect on blood pressure, but *in vivo* studies of RhoA-S188E transgenic mice remain to be done to clarify RhoA phosphorylation effect on blood pressure. The modulation of the vasoreactivity resulting from

the AMPK-RhoA phosphorylation pathway and its effect on VSMC proliferation and migration (Rolli-Derkinderen M., 2010) indicates that the AMPK-RhoA pathway activation may better help to counteract the healing defect observed in diabetic pathology (Bradley et al., ; Petrova and Edmonds, 2006)..

More than this we have identified a physiological context in which AMPK-RhoA pathway is activated: gender differences. Women develop coronary heart disease on average 10 years later than men. This has been attributed, at least in part, to the protective effects of female sex hormones, particularly estrogens, before menopause (Barton et al., 2007; Xing et al., 2009). The estradiol (E2) predominant estrogen mediates numerous beneficial effects assigned to estrogens, such as blood pressure lowering (Dubey et al., 2002; Zhu et al., 2002), angiogenesis promotion or early atheroma prevention (Arnal et al., 2010). E2 actions are mediated by genomic and non-genomic mechanisms. The classical genomic mechanism of E2 action involves activation of its nuclear receptor (estrogen receptor ER  $\alpha$  or  $\beta$ ), receptor dimerization, and subsequent binding to ER response elements located in the promoter of target genes. More recently, E2 has been shown to have rapid, non genomic biological effects, believed to be mediated through membrane-bound subpopulation of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  and/or the newly described G protein-coupled receptor 30 (GPR30) (Levin, 2001; Revankar et al., 2005). Concerning the vasculature, ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  are present both on endothelial and smooth muscle cells (Mendelsohn and Karas, 1999) but most of these studies concern the endothelium, and a few consider a possible smooth muscle implication. Indeed, endothelial ER stimulation induces vascular wall dilation (Fu and Simoncini, 2007; Guo et al., 2005) mainly through an increased nitric oxide production (Weiner et al., 1994) due to rapid eNOS activation (Chen et al., 1999; Guo et al., 2005; Haynes et al., 2000) or induction of eNOS expression (Gui et al., 2008). E2 has also been shown to stimulate endothelial cell survival and formation of primary capillary tube (Razandi et al., 2000). At the media level,

E2 regulate smooth muscle cell proliferation (Pare et al., 2002), differentiation, apoptosis (Ding et al., 2009) and even contraction (Gui et al., 2008). The mechanisms underlying these effects are poorly described, implicating ERK/MAPKs and p38/SAPKs2 balance or PI3K-Akt and Src signalling, and can not explain all the effects (Cheng et al., 2009; Ding et al., 2009; Haynes et al., 2000). The identification of AMPK activation and RhoA-Rock inhibition can explain E2 effects, and it would be interesting to consider AMPK activation and RhoA phosphorylation as inducers of estrogen vasoprotection, and even as mediators of estrogen signalling in the all the organism.

The complexe picture regarding the functions and the regulation of AMPK activity is far from complete, but our work shows that estradiol is indeed an AMPK activator, and that the small G protein RhoA is a direct target of AMPK.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Malvyne Rolli-Derkinderen is supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS). This work is supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). We thank Nathalie Vaillant for skillful technical assistance.

## REFERENCES

- Agard, C., Rolli-Derkinderen, M., Dumas-de-La-Roque, E., Rio, M., Sagan, C., Savineau, J.P., Loirand, G., and Pacaud, P. (2009). Protective role of the antidiabetic drug metformin against chronic experimental pulmonary hypertension. *British journal of pharmacology* 158, 1285-1294.
- Arnal, J.F., Fontaine, C., Billon-Gales, A., Favre, J., Laurell, H., Lenfant, F., and Gourdy, P. (2010). Estrogen receptors and endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30, 1506-1512.
- Barton, M., Meyer, M.R., and Haas, E. (2007). Hormone replacement therapy and atherosclerosis in postmenopausal women: does aging limit therapeutic benefits? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1669-1672.
- Begum, N., Sandu, O.A., and Duddy, N. (2002). Negative regulation of rho signaling by insulin and its impact on actin cytoskeleton organization in vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling pathways. *Diabetes* 51, 2256-2263.
- Bradley, E.A., Eringa, E.C., Stehouwer, C.D., Korstjens, I., van Nieuw Amerongen, G.P., Musters, R., Sipkema, P., Clark, M.G., and Rattigan, S. Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside in the muscle microcirculation increases nitric oxide synthesis and microvascular perfusion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30, 1137-1142.
- Budzyn, K., Marley, P.D., and Sobey, C.G. (2006). Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends in pharmacological sciences* 27, 97-104.
- Burridge, K., and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., and Shaul, P.W. (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *The Journal of clinical investigation* 103, 401-406.
- Cheng, B., Song, J., Zou, Y., Wang, Q., Lei, Y., Zhu, C., and Hu, C. (2009). Responses of vascular smooth muscle cells to estrogen are dependent on balance between ERK and p38 MAPK pathway activities. *International journal of cardiology* 134, 356-365.
- D'Eon, T.M., Rogers, N.H., Stancheva, Z.S., and Greenberg, A.S. (2008). Estradiol and the estradiol metabolite, 2-hydroxyestradiol, activate AMP-activated protein kinase in C2C12 myotubes. *Obesity (Silver Spring, Md)* 16, 1284-1288.
- Ding, Q., Gros, R., Limbird, L.E., Chorazyczewski, J., and Feldman, R.D. (2009). Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C1178-1187.

- Dubey, R.K., Oparil, S., Imthurn, B., and Jackson, E.K. (2002). Sex hormones and hypertension. *Cardiovascular research* 53, 688-708.
- Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., and Burridge, K. (2003). Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem* 278, 19023-19031.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fisslthaler, B., and Fleming, I. (2009). Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation research* 105, 114-127.
- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Gingras, D., and Beliveau, R. (2002). Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *The Biochemical journal* 361, 243-254.
- Fu, X.D., and Simoncini, T. (2007). Non-genomic sex steroid actions in the vascular system. *Seminars in reproductive medicine* 25, 178-186.
- Goirand, F., Solar, M., Athes, Y., Viollet, B., Mateo, P., Fortin, D., Leclerc, J., Hoerter, J., Ventura-Clapier, R., and Garnier, A. (2007). Activation of AMP kinase  $\alpha$ 1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol* 581, 1163-1171.
- Gudi, T., Chen, J.C., Casteel, D.E., Seasholtz, T.M., Boss, G.R., and Pilz, R.B. (2002). cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions. *J Biol Chem* 277, 37382-37393.
- Gui, Y., Zheng, X.L., Zheng, J., and Walsh, M.P. (2008). Inhibition of rat aortic smooth muscle contraction by 2-methoxyestradiol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H1935-1942.
- Guibert, C., Pacaud, P., Loirand, G., Marthan, R., and Savineau, J.P. (1996). Effect of extracellular ATP on cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in rat pulmonary artery myocytes. *The American journal of physiology* 271, L450-458.
- Guilluy, C., Bregeon, J., Toumaniantz, G., Rolli-Derkinderen, M., Retailleau, K., Loufrani, L., Henrion, D., Scalbert, E., Bril, A., Torres, R.M., Offermanns, S., Pacaud, P., and Loirand, G. (2010). The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nature medicine* 16, 183-190.
- Guilluy, C., Rolli-Derkinderen, M., Loufrani, L., Bourge, A., Henrion, D., Sabourin, L., Loirand, G., and Pacaud, P. (2008). Ste20-related kinase SLK phosphorylates Ser188 of RhoA to induce vasodilation in response to angiotensin II Type 2 receptor activation. *Circ Res* 102, 1265-1274.
- Guo, X., Razandi, M., Pedram, A., Kassab, G., and Levin, E.R. (2005). Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *The Journal of biological chemistry* 280, 19704-19710.

Hall, A. (1998). G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 280, 2074-2075.

Hardie, D.G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 144, 5179-5183.

Hardie, D.G. (2007a). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews* 8, 774-785.

Hardie, D.G. (2007b). AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell metabolism* 6, 339-340.

Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K.S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circulation research* 87, 677-682.

Horman, S., Morel, N., Vertommen, D., Hussain, N., Neumann, D., Beauloye, C., El Najjar, N., Forcet, C., Viollet, B., Walsh, M.P., Hue, L., and Rider, M.H. (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase. *The Journal of biological chemistry* 283, 18505-18512.

Igata, M., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Kojima, K., Matsumura, T., Kondo, T., Taguchi, T., Nakamaru, K., Yano, M., Kukidome, D., Matsumoto, K., Toyonaga, T., Asano, T., Nishikawa, T., and Araki, E. (2005). Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circulation research* 97, 837-844.

Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., and Sugimoto, T. (2009). Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression. *American journal of physiology* 296, E139-146.

Kanellis, J., Kandane, R.K., Etemadmoghadam, D., Fraser, S.A., Mount, P.F., Levidiotis, V., Kemp, B.E., and Power, D.A. (2006). Activators of the energy sensing kinase AMPK inhibit random cell movement and chemotaxis in U937 cells. *Immunology and cell biology* 84, 6-12.

Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., and Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *The EMBO journal* 15, 510-519.

Leonard, D., Hart, M.J., Platko, J.V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T., and Cerione, R.A. (1992). The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* 267, 22860-22868.

Levin, E.R. (2001). Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 91, 1860-1867.

Levine, Y.C., Li, G.K., and Michel, T. (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK → Rac1 → Akt

-> endothelial nitric-oxide synthase pathway. *The Journal of biological chemistry* 282, 20351-20364.

Loirand, G., Guerin, P., and Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circulation research* 98, 322-334.

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

Majithiya, J.B., and Balaraman, R. (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life sciences* 78, 2615-2624.

Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England journal of medicine* 340, 1801-1811.

Nagata, D., Takeda, R., Sata, M., Satonaka, H., Suzuki, E., Nagano, T., and Hirata, Y. (2004). AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 110, 444-451.

Ng, W.W., Keung, W., Xu, Y.C., Ng, K.F., Leung, G.P., Vanhoutte, P.M., Choy, P.C., and Man, R.Y. (2008). Genistein potentiates protein kinase A activity in porcine coronary artery. *Molecular and cellular biochemistry* 311, 37-44.

Oka, M., Fagan, K.A., Jones, P.L., and McMurtry, I.F. (2008). Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension. *British journal of pharmacology* 155, 444-454.

Olson, M.F. (2008). Applications for ROCK kinase inhibition. *Current opinion in cell biology* 20, 242-248.

Pare, G., Krust, A., Karas, R.H., Dupont, S., Aronovitz, M., Chambon, P., and Mendelsohn, M.E. (2002). Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circulation research* 90, 1087-1092.

Petrova, N., and Edmonds, M. (2006). Emerging drugs for diabetic foot ulcers. *Expert opinion on emerging drugs* 11, 709-724.

Quilliam, L.A., Mueller, H., Bohl, B.P., Prossnitz, V., Sklar, L.A., Der, C.J., and Bokoch, G.M. (1991). Rap1A is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase in human neutrophils. *J Immunol* 147, 1628-1635.

Razandi, M., Pedram, A., and Levin, E.R. (2000). Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *The Journal of biological chemistry* 275, 38540-38546.

Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y)* 307, 1625-1630.



Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G., and Pacaud, P. (2005). Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 96, 1152-1160.

Rolli-Derkinderen M., T.G., Pacaud P. and Loirand G. (2010). RhoA Phosphorylation Induces Rac1 Release from GDIalpha and Stimulation of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Mol Cell Biol*.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.

Sambandam, N., and Lopaschuk, G.D. (2003). AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Progress in lipid research* 42, 238-256.

Sandu, O.A., Ito, M., and Begum, N. (2001). Selected contribution: insulin utilizes NO/cGMP pathway to activate myosin phosphatase via Rho inhibition in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol* 91, 1475-1482.

Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., and Loirand, G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 275, 21722-21729.

Seasholtz, T.M., Majumdar, M., Kaplan, D.D., and Brown, J.H. (1999). Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 84, 1186-1193.

Soliman, H., Craig, G.P., Nagareddy, P., Yuen, V.G., Lin, G., Kumar, U., McNeill, J.H., and Macleod, K.M. (2008). Role of inducible nitric oxide synthase in induction of RhoA expression in hearts from diabetic rats. *Cardiovascular research* 79, 322-330.

Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological reviews* 83, 1325-1358.

Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322.

van Nieuw Amerongen, G.P., and van Hinsbergh, V.W. (2001). Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 300-311.

Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G., and Moncada, S. (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 5212-5216.

Xing, D., Nozell, S., Chen, Y.F., Hage, F., and Oparil, S. (2009). Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 289-295.

Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., Karas, R.H., Bao, L., Cox, D., Hodgins, J., Shaul, P.W., Thoren, P., Smithies, O., Gustafsson, J.A., and Mendelsohn, M.E. (2002). Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* (New York, N.Y) 295, 505-508.

#### FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. AMPK activation limits vasoconstriction and inhibits actin stress fibers and RhoA-Rock pathway.** AICAR (3mM) or metformin (Met, 4 mM) activators of AMPK were applied for 60 or 5 min respectively on phenylephrin (PHE)-precontracted mouse aortic rings to analyse their relaxing effects **(A)**. Concentration-response curves of PHE in mouse aortic rings pre-treated with AICAR or Met for 45min **(B)**. VSMC were treated with AICAR or 8-pCPT-cGMP for 16h before fixation and FITC-conjugated phalloidin staining of F-actin **(C)**. RhoA phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition were measured in parallel by western blot analysis using (pSER) antibodies on RhoA immunoprecipitation (RhoA IP) or using antibody that recognise the phosphorylated Thr 696 of MYPT ((p)MYPT) on total lysates (tot lysate). Quantification of MYPT or RhoA phosphorylation level is represented relative to the non stimulated condition taken as 1 **(D and F)**. Same analysis were performed on VSMC expressing the constitutively active form of AMPK (CA) or the dominant inactive form of AMPK (DN) **(E and G)**. \* $p < 0.05$  and # $p < 0.01$  treated versus non-treated or VSMC expressing a mutant versus mock at the same time. The data presented are representative of three to five independent experiments.

**Fig. 2. AMPK directly phosphorylates RhoA on Ser188.** Comparison of the human, *rattus norvegicus* or *mus musculus* RhoA sequences surrounding the Serine in position 188 with the consensus sequence for AMPK phosphorylation and with the sequence of SAMS (peptide use as a positive control for AMPK kinase assay) (A). Prediction of human RhoA sequences surrounding the Serine in position 188 for kinase-specific phosphorylation site using <http://ppsp.biocuckoo.org/index.php> (B). *In vitro* kinase assay measuring human recombinant AMPK activity on a control peptide substrate (SAMS) or on recombinant Wild Type- (WT-) or phosphoresistant- (S188A-) RhoA or an a negative control represented by human GDI sequence (C). \* $p < 0.05$  in presence of AMPK versus control (cont) or # $p < 0.05$  S188A-RhoA versus WT-RhoA. The data presented are representative of two independent experiments performed in triplicates.

**Fig. 3. Estradiol activates AMPK pathway and inhibits RhoA-Rock pathway activation through RhoA phosphorylation.** VSMC were treated with 17- $\beta$ -estradiol (E2) at a concentration of  $10^{-9}$ M for 0.5 to 20h (A to C) or with different concentration during 1h (D and E) before harvesting and western blot analysis. AMPK pathway activation was measured by using antibody that recognise the phosphorylated Ser 79 of AMPK ((p)ACC) (A). RhoA phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition were measured in parallel by western blot analysis using (pSER) antibodies on RhoA or HA immunoprecipitation (RhoA or HA IP) or using antibody that recognise the phosphorylated Thr 696 of MYPT ((p)MYPT) on total lysates (tot lysate) (B and C). Quantification of ACC, MYPT or RhoA phosphorylation level is represented relative to the non stimulated condition taken as 1 (A to E). Same analysis were performed on VSMC expressing the Wild Type- (WT-) or phosphoresistant- (S188A-) RhoA (F). \* $p < 0.05$  and # $p < 0.01$  treated versus non-treated or VSMC expressing a mutant versus wild-type at the same time. The data presented are representative of three to five independent experiments.

**Fig. 4. E2 induces RhoA phosphorylation through AMPK.** VSMC were treated with 17- $\beta$ -estradiol (E2) at a concentration of  $10^{-9}$ M for 1h without (control) or with pre-treatment with estrogen receptor

antagonist (ICI 182, 780 1 $\mu$ M), protein kinase A inhibitor (H89, 10 $\mu$ M) or AMPK inhibitor (compound C, 10 $\mu$ M) before harvesting and western blot analysis. AMPK pathway activation was measured by using antibody that recognise the phosphorylated Ser 79 of AMPK ((p)ACC). RhoA phosphorylation and RhoA-Rock pathway inhibition were measured in parallel by western blot analysis using (pSER) antibodies on RhoA immunoprecipitation (RhoA) or using antibody that recognise the phosphorylated Thr 696 of MYPT ((p)MYPT) on total lysate. Quantification of ACC, MYPT or RhoA phosphorylation level is represented relative to the non stimulated control condition taken as 1. \*p<0.05 treated by E2 versus non-treated and #p<0.05 pre-treated with inhibitor versus control. The data presented are representative of three independent experiments.

**Fig. 5. Estradiol activation of AMPK limits vasoconstriction.** Mean systolic blood pressure (MSP) in male or female wild-type mice (WT) and AMPK $\alpha$ 1 knock-out (KO) mice, ovariectomised (OVX) or not, and treated with E2 or not (A). Amplitude of the contraction induced by 60mM of KCl in aortic rings from wild-type mice (WT) and AMPK $\alpha$ 1 knock-out (KO) mice (B). Cumulative concentration-response curves of the action of 17- $\beta$ -estradiol (E2) on aortic rings from WT and KO mice, in the presence of NO-inhibitor (L-NAME 2.10<sup>-4</sup>M) or not. Contraction is expressed as a percentage of the maximal phenylephrine)-induced contraction (C). Cumulative concentration-response curves of the action of phenylephrine (PHE) (D) or serotonin (5HT) (E) on aortic rings from WT and KO mice, ovariectomised (OVX) or not, and treated with E2 or not. Contraction is expressed as a percentage of the maximal KCl (60mM)-induced contraction. RhoA phosphorylation was measured in parallel by western blot analysis using (pSER) antibodies on RhoA immunoprecipitation (RhoA). Quantification of RhoA phosphorylation level is represented relative to the level measured in WT taken as 1 (F). §p<0.05 OVX or KO versus WT and \*p<0.05 treated by E2 versus non-treated. The data presented are representative of three to seven independent experiments (five to ten mice per group).

**Fig. 6. Female hypertension development is delayed due to AMPKalpha1.** Mean systolic blood pressure was daily measured by tail-cuff in male or female wild-type mice (WT) and AMPKalpha1 knock-out (KO) mice during 14days (**A**). RhoA phosphorylation was measured by western blot analysis using (pSER) antibodies on RhoA immunoprecipitation (RhoA IP). AMPK pathway activation was measured by using antibody that recognise the phosphorylated Ser 79 of AMPK ((p)ACC) (**B**). Quantification of ACC or RhoA phosphorylation level is represented relative to the level measured in WT female taken as 1.  $\$p < 0.05$  KO versus WT and  $*p < 0.05$  male versus female. The data presented are representative of three to seven independent experiments (five to eight mice per group).

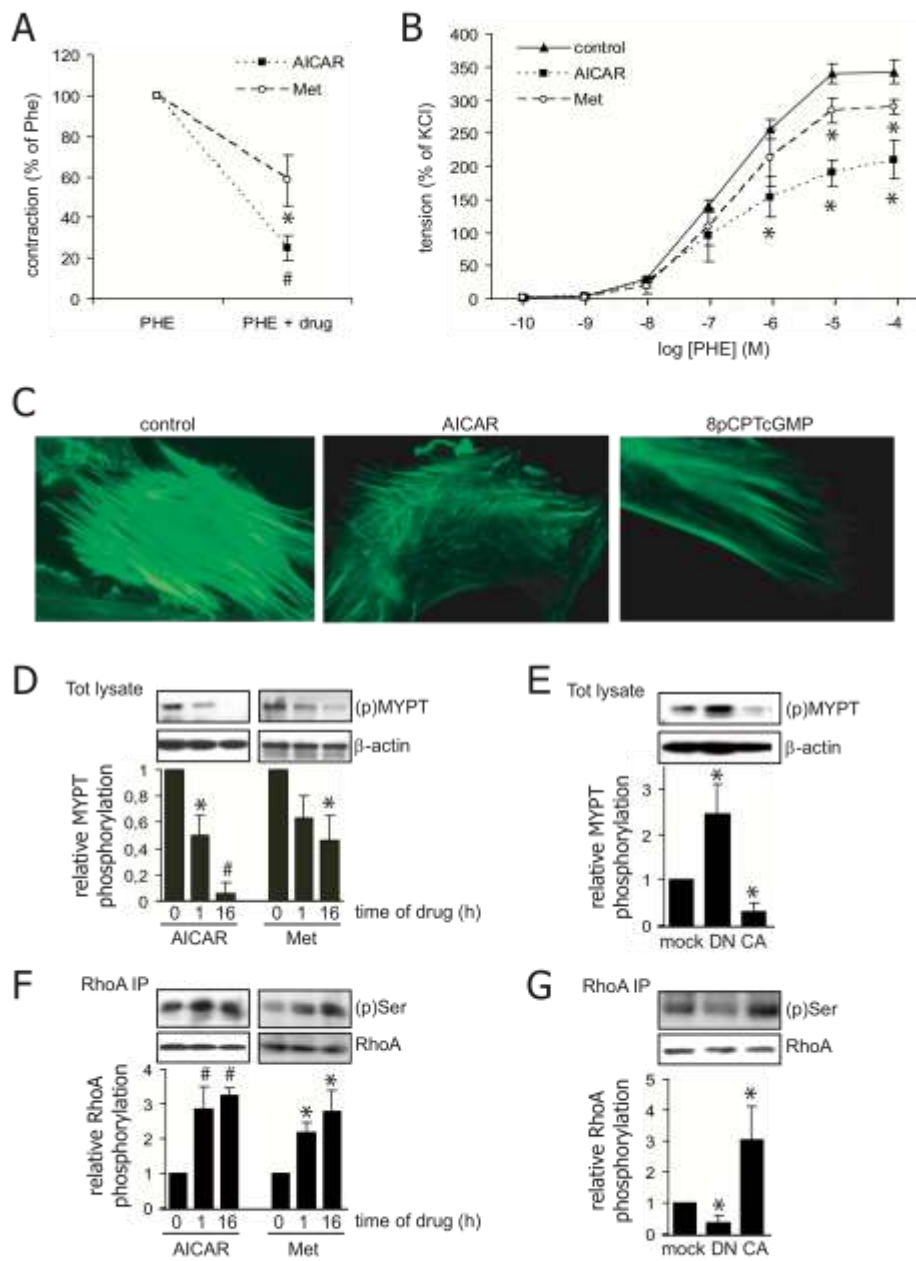


Fig1

A

consensus	f(X,b)XX S TXXXf	f=MVLIF ; b=R>K>H
SAMS	HMRSAM S GLHLVKKR	
human RhoA	GKKK S GCLVL	
rattus norvegicus RhoA	GKKK S GCLIL	
mus musculus RhoA	GKKK S GCLIL	

B

Name	Position	Kinase	Peptide	Threshold	Risk-Diff.
RhoA	188	AMPK	GKKKSGCLV	3.3	3.50
RhoA	188	PKG	GKKKSGCLV	3.1	3.46

C

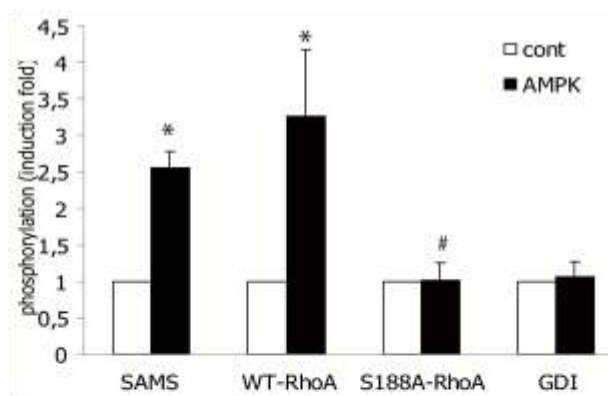


Fig2

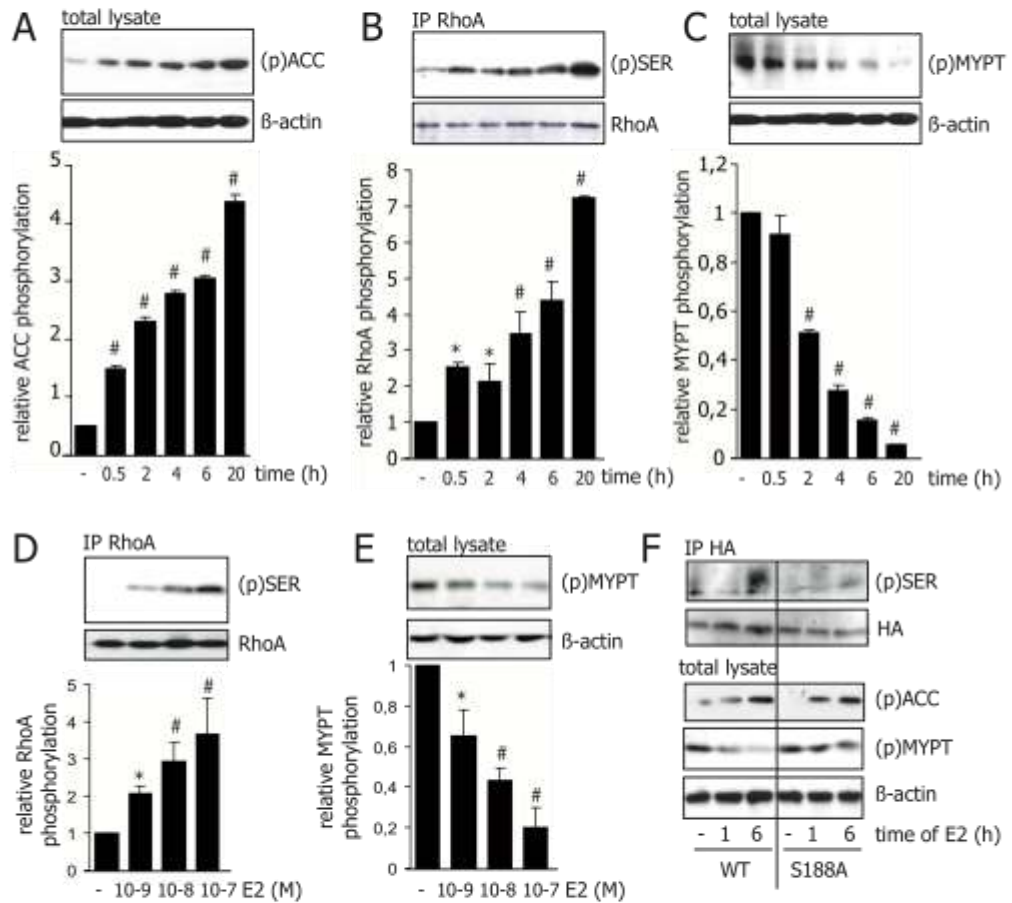


Fig3



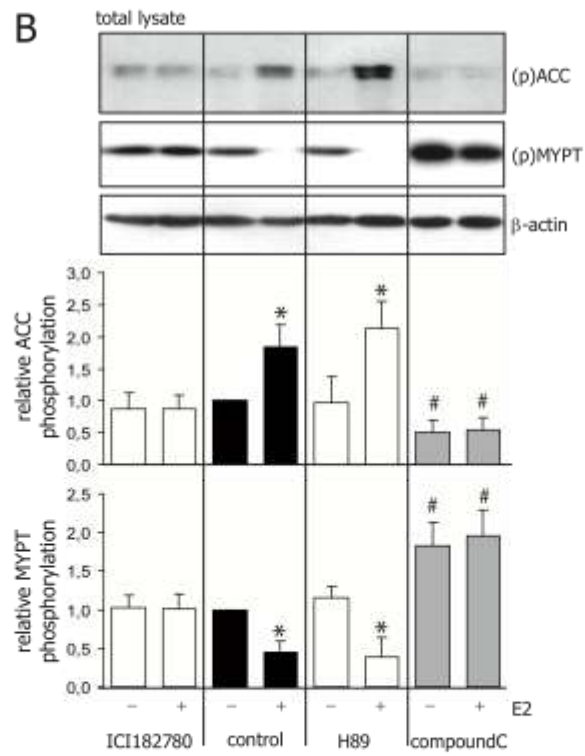
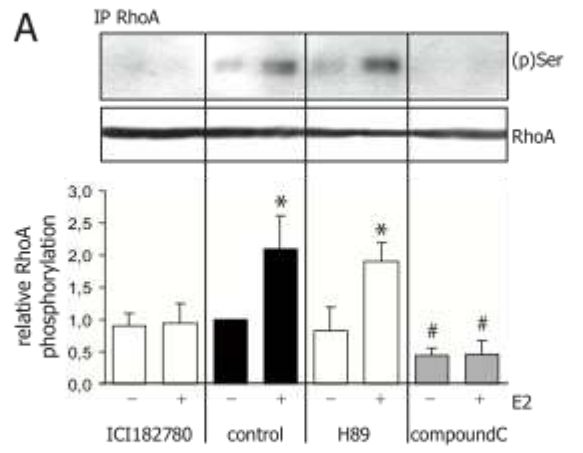


fig4

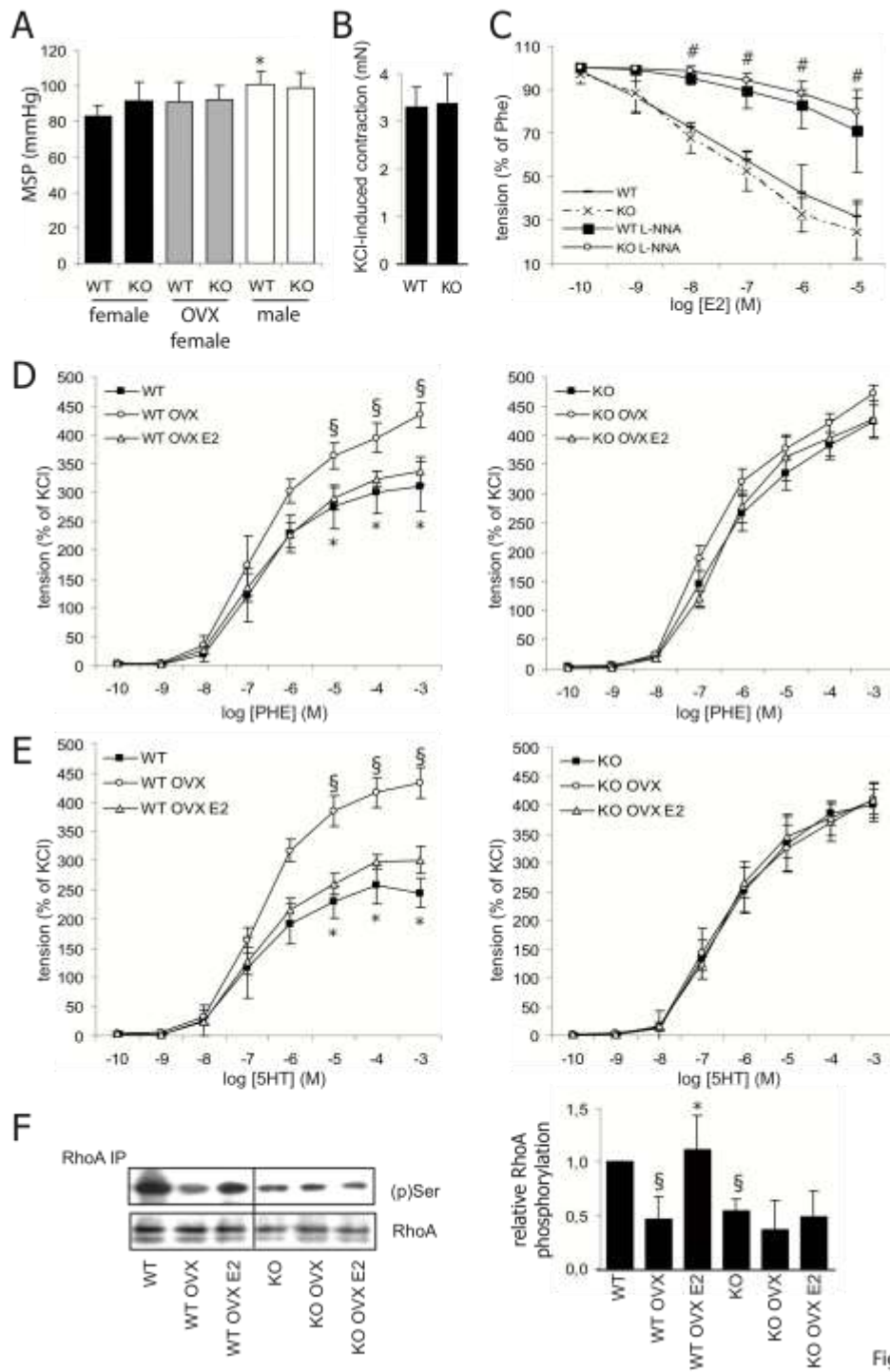


Fig 5

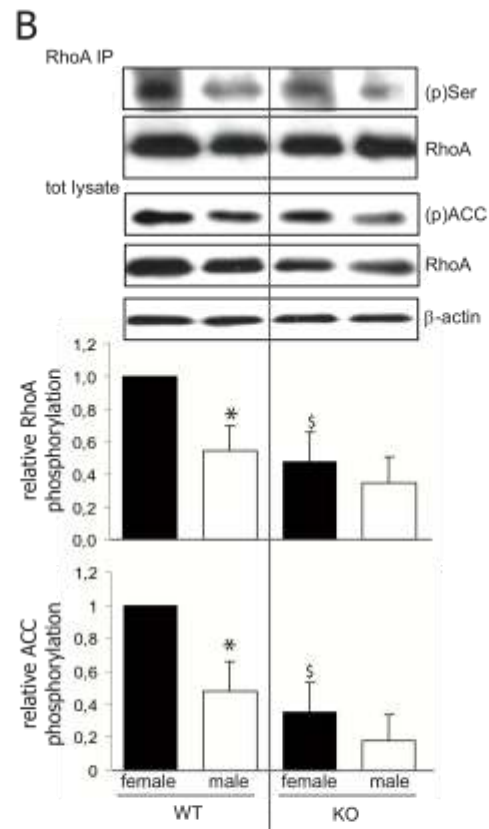
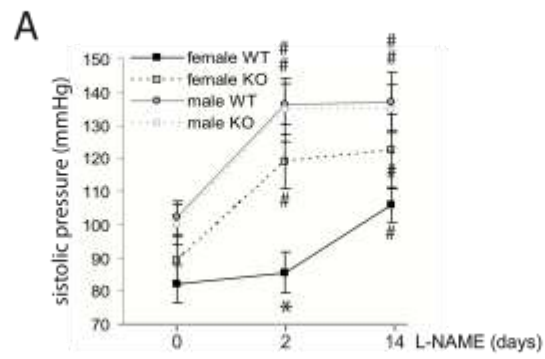


Fig 6

**Nom – Prénoms :** GAYARD Marion, Claire, Annick

**Titre de la thèse :** Étude des rôles de la phosphorylation de RhoA : nouveaux partenaires et effet vasoprotecteur de l'estradiol.

---

**Résumé de la thèse :**

RhoA a un rôle crucial dans la régulation des fonctions vasculaires et une suractivation de la protéine a été associée à plusieurs pathologies vasculaires. Notre équipe s'intéresse à la régulation de RhoA par phosphorylation, mais ce mécanisme d'inactivation reste encore peu connu. L'objectif de ce travail est donc 1) d'identifier de nouvelles kinases responsables de la phosphorylation de RhoA, et 2) d'identifier les partenaires et les régulateurs potentiels de la protéine phosphorylée. Avec ce travail, nous avons mis en évidence une nouvelle kinase de RhoA, l'AMPK, qui phosphoryle la protéine sur son résidu sérine en position 188 et est capable d'induire l'inhibition de la voie RhoA-Rock. Nous avons également montré que l'estradiol induit la phosphorylation de RhoA et l'inhibition de la voie RhoA-Rock, et que cet effet est médié par l'AMPK. Par la suite, des études de vasoréactivité nous ont permis de mettre en évidence un effet vasoprotecteur de l'estradiol et de l'AMPK. Enfin, l'étude des partenaires de RhoA phosphorylée a permis d'identifier principalement des protéines du cytosquelette mais aussi, M-RIP et Hsp70, dont l'étude pourrait permettre de mieux comprendre les conséquences de la phosphorylation de RhoA.

---

**MOTS CLÉS :**

**RHOA – PHOSPHORYLATION – AMPK**  
**ESTRADIOL – CMLV**

---

**JURY**

**PRESIDENT :**

M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie Générale et Clinique  
Faculté de Pharmacie de Nantes

**DIRECTEUR DE THÈSE :**

Mme Malvyne ROLLI-DERKINDEREN, Chargée de Recherche CNRS  
Inserm U915  
IRT-UN, 8 Quai Moncusu, 44007 Nantes Cedex1

**ASSESEUR :**

Mme Chrystelle CARIO-TOUMANIANTZ, Maître de Conférences de Physiologie animale  
IRT-UN, 8 Quai Moncusu, 44007 Nantes Cedex1

---

**Adresse de l'auteur :** 9 Rue Jacques Cartier, 44300 NANTES