

Tonus des muscles lisses vasculaires : transmissions du signal dépendantes et indépendantes du Ca^{2+}

**Gervaise Loirand
Anne-Marie Lompré
Jean-Pierre Savineau
Pierre Pacaud**

Les variations du Ca^{2+} libre intracellulaire jouent un rôle complexe dans la régulation du tonus vasculaire. Le Ca^{2+} entre essentiellement dans les cellules musculaires lisses par les canaux dépendants du potentiel; celui-ci est réglé par les concentrations intracellulaires de K^+ et de Cl^- dont les canaux sont eux-mêmes dépendants du Ca^{2+} . Les mouvements de Ca^{2+} intracellulaire entre les lieux de stockage (réticulum sarcoplasmique) et le cytoplasme sont réglés d'une part, par les récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate et de la ryanodine et, d'autre part, par la Ca^{2+} -ATPase. La modulation de la force contractile des fibres musculaires lisses est liée à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine qui dépend de l'équilibre entre les kinases et les phosphatases spécifiques. La MLCK (kinase des chaînes légères de la myosine) est activée par un complexe Ca^{2+} -calmoduline formé lors de l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . L'activité de la MLCP (phosphatase des chaînes légères de la myosine) dépend de messagers intracellulaires (acide arachidonique, diacylglycérol, PKC). La sensibilité de l'appareil contractile, à concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique constante, est réglée assez spécifiquement par l'inhibition de la MLCP, qui pourrait être contrôlée, notamment par des protéines G.

ADRESSES

G. Loirand : *chargée de recherche à l'Inserm*.
P. Pacaud : *chargé de recherche au Cnrs*. Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Cnrs UPR 411, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. A.M. Lompré : *directeur de recherche à l'Inserm*. Cnrs Ura 1131, bâtiment 443, université de Paris Sud, 91405 Orsay, France. J.P. Savineau : *maître de conférences des universités*. Laboratoire de physiologie, université de Bordeaux II, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux, France.

Le tonus vasculaire, déterminé par l'état contractile des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux contrôle la pression artérielle et la répartition des débits. Les deux principaux facteurs conditionnant le

degré de contraction et de relaxation des cellules musculaires lisses sont la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique et la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile. Schématiquement, les vasoconstricteurs élèvent la concentration de Ca^{2+} libre cytoplas-

RÉFÉRENCES

1. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-6.
2. Quast U. Do the K⁺ openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 332-7.
3. Hirst GDS, Edward FR. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 1989; 69: 546-604.
4. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268: C799-822.
5. Hogg RC, Wang Q, Large WA. Time-course of spontaneous calcium-activated chloride currents in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J Physiol* 1993; 464: 15-31.
6. Klöckner U. Intracellular calcium ions activate a low conductance chloride channel in smooth muscle cells isolated from human mesenteric artery. *Pflügers Arch* 1993; 424: 231-7.
7. Pacaud P, Loirand G, Grégoire G, Mironneau C, Mironneau J. Calcium-dependence of the calcium-activated chloride current in smooth muscle cells of rat portal vein. *Pflügers Arch* 1992; 421: 125-30.
8. Butler A, Tsunoda S, McCobb DP, Wei A, Swofford L. *mSlo*, a complex mouse gene encoding «maxi» calcium-activated potassium channels. *Science* 1993; 261: 221-4.
9. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995; 270: 633-7.
10. Kuriyama H, Kitamura K, Nabata H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 387-573.

mique et sensibilisent l'appareil contractile au Ca²⁺, les vasorelaxants diminuent la concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique et désensibilisent l'appareil contractile au Ca²⁺.

La concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique résulte d'un équilibre entre, d'une part, les sorties de Ca²⁺ vers le milieu extracellulaire (via les Ca²⁺-ATPases membranaires et, d'autre part, dans une moindre mesure l'échangeur Na⁺-Ca²⁺) ou le réticulum sarcoplasmique, et les entrées de Ca²⁺ à partir du milieu extracellulaire ou des compartiments calciques intracellulaires. Les entrées de Ca²⁺ extracellulaire sont essentiellement modulées par le potentiel de membrane (couplage électromécanique), les libérations de Ca²⁺ et la sensibilité de l'appareil contractile au Ca²⁺ dépendant de messagers intracellulaires (couplage pharmacomécanique). Néanmoins, il apparaît que ces deux types de transmission du signal sont étroitement imbriqués [1] : (1) le potentiel de membrane peut en effet modifier non seulement l'activité de canaux ioniques membranaires mais également celle d'enzymes intracellulaires, en particulier la phospholipase C, modulant ainsi la concentration de messagers intracellulaires et la sensibilité de l'appareil contractile au Ca²⁺ [2]; (2) par ailleurs, les seconds messagers et la libération de Ca²⁺ intracellulaire contrôlent des canaux ioniques membranaires qui, en retour, modulent le potentiel de membrane. Dans cet article, nous aborderons tour à tour les mécanismes qui modulent les flux de Ca²⁺ et la sensibilité de l'appareil contractile au Ca²⁺ des cellules musculaires lisses vasculaires.

Potentiel de membrane et tonus vasculaire

Les muscles lisses peuvent être schématiquement séparés en deux classes, les muscles phasiques et les muscles toniques, en fonction de leurs propriétés physiologiques intrinsèques déterminées par l'expression de différents canaux ioniques et de différentes isoformes de protéines contractiles [1, 2]. Les muscles lisses phasiques (vaisseaux de résistance) peuvent produire des potentiels d'action et des

contractions rapides et transitoires grâce à la synthèse d'isoformes rapides de myosine. Les potentiels d'action des cellules musculaires lisses vasculaires sont essentiellement des potentiels d'action calciques dus à l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel. A l'opposé, les muscles lisses toniques (grosses artères élastiques) répondent aux stimulus excitateurs par des dépolarisations et des contractions lentes et maintenues, liées à l'abondance d'isoformes lentes de la myosine.

En fonction des territoires vasculaires, le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses varie entre -45, -50 mV dans les cellules possédant une activité électrique spontanée (veine porte), -55, -60 mV dans les grosses artères et les veines capacitives et -65, -70 mV dans les artères et les veines de résistance [3]. Ces valeurs, plus positives que le potentiel d'équilibre pour les ions K⁺ (-85, -90 mV) sont dues à une concentration intracellulaire en ions Cl⁻ relativement importante amenant le potentiel d'équilibre pour cet anion entre -20 et -30 mV.

La modulation du potentiel de membrane est un élément important de la régulation du tonus vasculaire: une dépolarisation ou une hyperpolarisation de 3 mV augmente ou diminue de deux fois l'entrée de Ca²⁺ par les canaux calciques dépendants du potentiel, produisant respectivement une vasoconstriction ou une vasodilatation significative [4].

Deux types de canaux ioniques interviennent majoritairement dans la modulation du potentiel de membrane dans les cellules musculaires lisses vasculaires: des canaux K⁺ et des canaux Cl⁻, ouverts par l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique; on les dit dépendants du Ca²⁺. L'activation de ces canaux Cl⁻ déplace le potentiel de membrane dans le sens d'une dépolarisation et l'ouverture des canaux K⁺ le déplace dans le sens d'une hyperpolarisation.

Les canaux Cl⁻ dépendants du Ca²⁺

Ces canaux (Cl_{Ca}) sont présents dans les myocytes artériels et veineux [5]. Ils sont ouverts par le Ca²⁺ libéré à partir des compartiments intracellulaires de stockage lors de l'action

d'agonistes stimulant la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP₃), mais également par des microlibérations spontanées de Ca²⁺ [5] (figure 1). La conductance unitaire des canaux Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses vasculaires est de 2,8 pS [6]. Les mécanismes de régulation et la structure de ces canaux ne sont pas connus, et l'absence d'outils pharmacologiques spécifiques empêche actuellement de définir avec précision l'implication des canaux Cl_{Ca} dans le contrôle du potentiel de membrane et du tonus vasculaire. Néanmoins, la gamme de concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique dans laquelle ils peuvent être activés (100-600 nM) [7] suggère qu'ils joueraient un rôle physiologique.

Les canaux K⁺ dépendants du Ca²⁺

Ces canaux (K_{Ca}) des muscles lisses vasculaires sont essentiellement des canaux de grande conductance (200 à 300 pS en présence de K⁺ à la même concentration, 140 mM, de part et d'autre de la membrane) [4]. Ils sont activés à des concentrations de Ca²⁺ libre cytoplasmique submicromolaires et leur probabilité d'ouverture est augmentée par la dépolarisation membranaire. Tout comme les canaux Cl_{Ca}, les canaux K_{Ca} semblent plus sensibles au Ca²⁺ provenant de la libération de Ca²⁺ intracellulaire que du Ca²⁺ ayant franchi la membrane plasmique.

Les canaux K_{Ca} dont les gènes (*mSlo* pour murine *Slo*) ont été récemment clonés chez les mammifères [8], possèdent six domaines transmembranaires (S1-S6). La partie liant les segments S5 et S6 forme le pore, et le domaine S4 constitue la partie du canal sensible au potentiel de membrane. Quatre segments (S7-S10), conservés entre les espèces, confèrent à la protéine-canal sa sensibilité au Ca²⁺ intracellulaire. Plusieurs types de canaux K_{Ca}, avec des conductances et des sensibilités au Ca²⁺ variables, peuvent être produits à partir du même gène. La structure moléculaire des canaux K_{Ca} des muscles lisses vasculaires n'est pas encore identifiée, mais il est vraisemblable qu'ils sont codés par les gènes appartenant à la famille *mSlo*. Les canaux K_{Ca}, dont l'activation hyperpolarise la membrane et, par

cette voie, diminue le tonus vasculaire, sont inhibés par de faibles concentrations (de l'ordre de 10 nM) de charybdotoxine ou d'ibérottoxine qui semble plus spécifique [4]. Ces deux inhibiteurs produisent une dépolarisation des cellules musculaires lisses et la vasoconstriction d'artères cérébrales et coronaires, suggérant que les canaux K_{Ca} participeraient au maintien du tonus basal. En effet, en l'absence de toute stimulation, l'activation des canaux K_{Ca} résulte de microlibérations spontanées de Ca²⁺ à partir de compartiments intracellulaires de stockage situés sous la membrane plasmique [9]. La régionalisation des variations de concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique a donc des conséquences physiologiques de première importance: si l'augmentation globale de la concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique est effectivement associée à une vasoconstriction, les augmentations de concentration sous-membra-

naire peuvent induire une vasodilatation.

Il apparaît clairement aujourd'hui que les canaux K_{Ca}, qui sont modulés par des messagers intracellulaires, sont impliqués dans les effets d'agents vasorelaxants aussi importants que les facteurs endothéliaux: le monoxyde d'azote (NO), l'*endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF), le facteur natriurétique auriculaire et les agonistes β-adrénérgiques [10] (figure 1). Dans les artères coronaires et l'aorte, leur phosphorylation *via* la protéine kinase activée par l'AMP cyclique (PKA) ainsi qu'un effet direct de la protéine Gαs sont capables d'activer les canaux K_{Ca} [11, 12]. Des travaux récents montrent que la phosphorylation de ces canaux par la protéine kinase activée par le GMP cyclique (PKG) permet également leur activation dans les cellules musculaires lisses artérielles [13]. Ces diverses phosphorylations augmenteraient leur sensibilité au

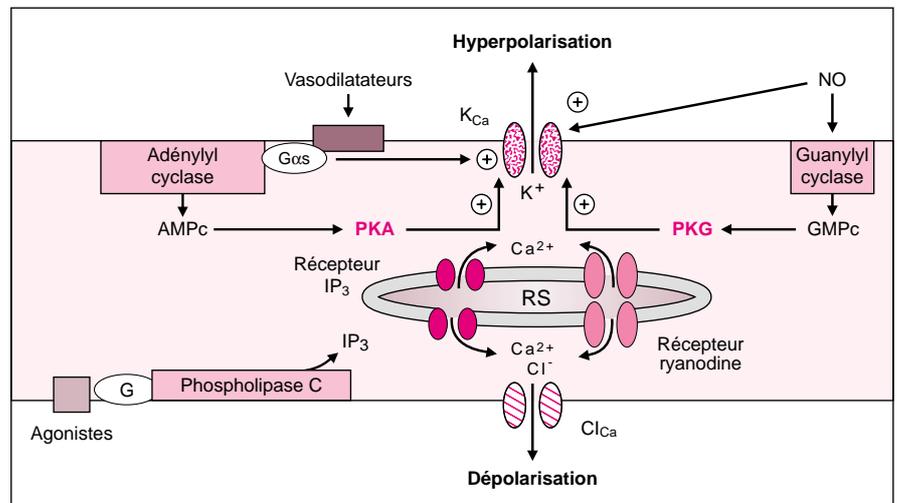


Figure 1. **Régulation des canaux ioniques dépendants du Ca²⁺ des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires.** Deux types de conductance dépendante du Ca²⁺ modulent le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses vasculaires: les canaux K⁺ dépendants du Ca²⁺ (K_{Ca}) pour les hyperpolarisations et les canaux Cl⁻ dépendants du Ca²⁺ (Cl_{Ca}) pour les dépolarisations. Ces deux types de canaux sont ouverts par l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique, en particulier par la libération du Ca²⁺ des compartiments de stockage intracellulaire tel que le réticulum sarcoplasmique (RS). Le Ca²⁺ est libéré, soit par l'ouverture des canaux-récepteurs de la ryanodine, du réticulum sarcoplasmique, soit par les canaux-récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) produit lors de l'activation de récepteur couplé à la phospholipase C par une protéine G. Les canaux K_{Ca} sont stimulés directement par le monoxyde d'azote (NO) et par des mécanismes de phosphorylation impliquant les protéine kinases A (PKA) et G (PKG) activées respectivement par l'AMP cyclique (AMPc) et le GMP cyclique (GMPc). La protéine Gαs qui active l'adénylyl cyclase peut également stimuler directement les canaux K_{Ca}.

RÉFÉRENCES

11. Sadoshima JJ, Akaike N, Kanaide H, Nakamura M. Cyclic AMP modulates Ca-activated K⁺ channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. *Am J Physiol* 1988; 255: H754-9.
12. Scornik FS, Codina J, Birnbaumer L, Toro L. Modulation of coronary smooth muscle K_{Ca} channels by G_α independent of phosphorylation by protein kinase A. *Am J Physiol* 1993; 265: H1460-5.
13. Taniguchi H, Furukawa KI, Shigekawa M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1993; 463: 167-72.
14. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagamo PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368: 850-3.
15. Somlyo AP. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res* 1985; 57: 497-507.
16. Lompré AM, Anger M, Levitsky D. Sarco(end)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 1109-21.
17. Raeymaekers L, Wuytack F. Ca²⁺ pumps. In: Barany M, ed. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. New York: Academic Press, 1996: 241-53.
18. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994; 74: 595-636.
19. Somlyo AP, Somlyo AV. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1968; 159: 129-59.
20. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-25.

Ca²⁺. L'implication des canaux K_{Ca} dans la vasorelaxation induite par le monoxyde d'azote ne semble pas uniquement liée à l'augmentation de la production de GMP cyclique puisque le monoxyde d'azote serait capable d'activer directement les canaux K_{Ca} [14]. Ces canaux participent donc activement au contrôle du tonus vasculaire et représentent un effecteur important des médiateurs vasoactifs, modulant la dépolarisation et la contraction induite par des agents vasoconstricteurs, ou l'hyperpolarisation et le renforcement de la relaxation induite par des agents vasodilatateurs.

Flux de Ca²⁺ et potentiel de membrane

Deux sources majeures de Ca²⁺ sont utilisées par les cellules musculaires lisses: les compartiments intracellulaires de stockage du Ca²⁺, essentiellement constitués par le réticulum sarco/endoplasmique et le compartiment extracellulaire. Le Ca²⁺ passe de ces compartiments au cytosol par des canaux perméables au Ca²⁺ de la membrane du réticulum ou de la membrane plasmique. L'abondance du réticulum et son importance dans la contraction sont plus grandes dans les grosses artères élastiques (aorte, artère pulmonaire) que dans les petites artères musculaires [15-17].

Le compartiment calcique intracellulaire

Un compartiment intracellulaire de stockage du Ca²⁺ se caractérise par la présence de trois types de protéines: des protéines intraluminales liant le Ca²⁺, des canaux calciques libérant le Ca²⁺ dans le cytosol après activation et, enfin, des Ca²⁺-ATPases capables de capter à nouveau le Ca²⁺ du cytosol.

La concentration totale en Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique est de 1 mM, mais il est difficile de déterminer la proportion de Ca²⁺ libre et de Ca²⁺ lié. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, de nombreuses protéines lient le Ca²⁺ dans le réticulum: la calséquestrine, la sarcoluménine, la calréticuline, la HCP (*histidine-rich Ca²⁺ binding protein*), l'endoplasmine ou Grp 94, la protéine disulfide isomérase et la BiP (*immunoglobulin bin-*

ding protein) [18]. La calséquestrine et la calréticuline fixent le Ca²⁺ avec une affinité relativement faible mais une forte capacité, et jouent le rôle de tampon calcique. La calréticuline semble correspondre à une isoforme non musculaire de calséquestrine; présente dans les cellules musculaires squelettiques et les cellules cardiaques indifférenciées, elle disparaît au profit de la calséquestrine au cours de la différenciation. Elle est très abondante dans les cellules musculaires lisses.

Deux types de canaux calciques peuvent libérer le Ca²⁺ des réservoirs calciques intracellulaires des muscles lisses vasculaires: un récepteur-canal activé par l'inositol 1,4,5 trisphosphate (InsP₃) et un canal activé par le Ca²⁺ et défini pharmacologiquement comme étant le site de liaison spécifique d'un alcaloïde, la ryanodine.

Il est maintenant évident que l'InsP₃ est le médiateur du couplage « pharmacomécanique » défini dans le muscle lisse par Somlyo et Somlyo [19]. L'InsP₃ agit en libérant le Ca²⁺ des compartiments internes après fixation sur un récepteur-canal spécifique de la membrane du réticulum; ce mécanisme ubiquitaire a été bien décrit par Berridge en 1993 [20]. L'ADNc du récepteur de l'InsP₃ a été cloné dans les années 1990 [21]. Différents types de récepteurs de l'InsP₃, produits à partir de plusieurs gènes ou par épissage alternatif d'un seul gène ont été identifiés. Le récepteur de type I est présent dans tous les types cellulaires alors que la proportion des récepteurs de type II, III, IV et V varie selon le type cellulaire considéré [22]. Les sous-unités du récepteur de l'InsP₃ s'associent en homo ou hétérotétramères [23, 24] dont les parties carboxy-terminales se combinent pour former un canal calcique. Les parties cytosoliques contiennent les sites de fixation de l'InsP₃, l'affinité étant différente selon les isoformes. Une zone régulatrice contient les sites de phosphorylation (*in vitro*, le récepteur de l'InsP₃ est phosphorylé par la PKA, la protéine kinase C (PKC) et la Ca²⁺/calmoduline kinase II) et de régulation par les nucléotides adényliques. La phosphorylation du récepteur de l'InsP₃ par la PKA augmente la sensibilité à l'InsP₃, mais la signification physiologique des autres phosphory-

lations n'est pas encore claire. Les propriétés de ce canal calcique ont été largement décrites [24]. La libération de Ca^{2+} se fait de manière progressive en réponse à des concentrations croissantes d' InsP_3 et plusieurs hypothèses ont été fournies pour expliquer ce phénomène [25].

Le second mécanisme de libération du Ca^{2+} dans les cellules musculaires lisses vasculaires correspond au *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release* (CICR) : une variation modérée de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique provoque la libération massive de Ca^{2+} à partir des compartiments internes. La libération du Ca^{2+} est alors liée à l'activation d'un canal calcique sensible à la ryanodine. Le CICR a été mis en évidence tout d'abord dans le muscle squelettique, puis dans le cœur et enfin dans le muscle lisse [26]. La libération du Ca^{2+} par le CICR est activée par le Ca^{2+} à concentration micromolaire ; la caféine augmente la sensibilité au Ca^{2+} et favorise donc sa libération. La ryanodine se fixe sur ce canal calcique avec une forte affinité et le maintient ouvert, induisant ainsi la déplétion des compartiments de stockage. Parmi les activateurs les plus connus du CICR on peut citer les nucléotides adényliques et l'ADP ribose cyclique, qui n'agit qu'en présence de calmoduline. L'effet de cet ADP sur le relargage de Ca^{2+} dans le muscle lisse n'est pas clairement établi [27] : il pourrait lever l'effet inhibiteur normalement exercé par la calmoduline. Le Mg^{2+} , le Ca^{2+} (concentration millimolaire), la ryanodine (concentration micromolaire), le rouge de ruthénium, la tétracaïne, le dantrolène et la spermine inhibent également le CICR. Enfin, la protéine FKBP12 qui lie l'immunosuppresseur FK506 augmente la conductance du canal calcique.

Le récepteur de la ryanodine est composé de quatre sous-unités, de 500 kDa chacune, dont les parties carboxy-terminales transmembranaires s'associent pour former le canal calcique (*m/s n° 1, vol. 6, p. 72*). Les régions transmembranaires ainsi que les parties carboxy-terminales des récepteurs de la ryanodine et de l' InsP_3 sont très conservées. Les parties amino-terminales constituent les protéines « pied » (*foot-proteins*). Entre ces deux zones se situe une région

régulatrice où se trouvent le site de fixation de la calmoduline (qui inhibe l'activité du canal), les sites de phosphorylation par la PKA et par la kinase dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline ainsi que les sites de forte et faible affinité pour le Ca^{2+} . Trois ADNc codant pour trois types de récepteur de la ryanodine (RyR), ont été clonés à ce jour. Le récepteur RyR1 est présent dans les muscles squelettiques rapides et lents, RyR2 dans le cœur, l'œsophage et certaines parties du cerveau et RyR3 dans les cellules épithéliales, les muscles lisses utérin et aortique, dans l'urètre mais également dans le cerveau [28, 29]. Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant le type de récepteur RyR synthétisé dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Selon les auteurs et les techniques utilisées, on a pu détecter, soit uniquement RyR3 [28], soit les trois types de récepteurs [30]. Lors de la relaxation de la cellule, le Ca^{2+} est capté à nouveau dans les compartiments internes par les Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique (SERCA). Des revues récentes ont été consacrées à la structure et à la fonction des SERCA [31, 32] et également à leur synthèse et à leur régulation dans le muscle lisse et le système cardiovasculaire [16, 17]. Les SERCA sont codées par une famille de trois gènes *SERCA1*, 2 et 3 donnant naissance à cinq isoformes synthétisées de façon différente selon les tissus et les stades du développement. Une nouvelle isoforme SERCAx a été décrite dans les plaquettes [33] mais la relation entre cette nouvelle isoforme et celles précédemment décrites reste à éclaircir. Les gènes *SERCA 2* et *SERCA 3* s'expriment dans les cellules vasculaires : la protéine SERCA3 est présente dans les cellules endothéliales [34] et les isoformes SERCA2a et 2b, produites par épissage alternatif du gène *SERCA2*, sont toutes deux présentes dans les cellules musculaires lisses de l'aorte, SERCA2b étant l'isoforme majoritaire (70 %). Dans les cellules musculaires lisses de l'aorte de rat, la proportion de SERCA2a augmente avec l'âge [35] et en présence de PDGF (*platelet derived growth factor*) [36]. Par ailleurs, la synthèse de SERCA2 dans l'aorte et de SERCAx dans les plaquettes est plus importante chez les

rats spontanément hypertendus que chez les normotendus, entraînant une activité plus importante du réticulum [37, 38].

Toutes les SERCA partagent les mêmes propriétés générales : elles transportent deux ions Ca^{2+} par molécule d'ATP hydrolysée (*m/s n° 3, vol. 13, p. 377*). Les cinq isoformes transportent le Ca^{2+} à la même vitesse mais diffèrent par leur sensibilité au Ca^{2+} : $2b > 2a = 1 > 3$. Contrairement aux autres isoformes, SERCA3 n'est pas inhibée par le phospholamban. En effet, dans le cœur et le muscle lisse, l'activité du réticulum est contrôlée par la phosphorylation (par PKA, PKC, PKG et la Ca^{2+} /calmoduline kinase II) d'une protéine associée à la Ca^{2+} -ATPase : le phospholamban (*figure 2*). A l'état déphosphorylé, le phospholamban est lié à la Ca^{2+} -ATPase et inhibe son activité en diminuant son affinité pour le Ca^{2+} . Lorsque le phospholamban est phosphorylé, il est relargué de son site de fixation sur l'ATPase, accélérant le transport du Ca^{2+} . Le phospholamban est présent dans le muscle cardiaque et dans le muscle lisse vasculaire et viscéral. Cependant, l'effet des phosphorylations sur la stimulation du transport de Ca^{2+} est plus faible dans le muscle lisse que dans le cœur et des variations importantes, probablement liées à une variation de la stœchiométrie phospholamban/ATPase, sont observées entre les différents muscles lisses [17].

Plusieurs études suggèrent que, dans les muscles lisses, la diminution du Ca^{2+} cytosolique est plus importante sous l'effet du GMP cyclique que de l'AMP cyclique. Cette observation est vraisemblablement liée à l'abondance de PKG dans les cellules musculaires lisses, qui peut être activée par le GMP cyclique mais également, avec une affinité moins bonne, par l'AMP cyclique. Les agents relaxants qui augmentent le GMP cyclique induisent la phosphorylation du phospholamban qui est associée à une augmentation du transport de Ca^{2+} dans le réticulum. Par ailleurs, les inhibiteurs spécifiques des SERCA : la thapsigargine, l'acide cyclopiazonique, et le 2,5-di (*tert-butyl*)-1,4-benzohydroquinone réduisent la relaxation induite par le GMP cyclique ou l'AMP cyclique (*voir*

RÉFÉRENCES

21. Mikoshiba K. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *Trends Physiol Sci* 1993; 14: 86-9.
22. de Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Bootman MD, Mertens L, Van Den Bosch L, Castels R. Determination of the relative amounts of inositol trisphosphate receptor mRNA isoforms by ratio polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1994; 269: 21691-8.
23. Wojcikiewicz RJH, He Y. Type I, II and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor co-immunoprecipitation as evidence for the existence of heterotetrameric receptor complexes. *Biochim Biophys Res Commun* 1995; 213: 334-41.
24. Mauger JP. Régulation du récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate. *Med Sci* 1994; 10: 1013-7.
25. Steenbergen JM, Fay FS. The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 1996; 271: 1821-4.
26. Itoh T, Kajiwaru M, Kitamura K, Kuriyama H. Roles of stored calcium on the mechanical response evoked in smooth muscle cells of the porcine coronary artery. *J Physiol* 1982; 322: 107-23.
27. Galione A, Sethi J. Cyclic ADP-ribose and calcium signaling. In: Barany M, ed. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. New York: Academic Press, 1996: 295-305.
28. Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 1992; 312: 229-35.
29. Sorrentino V, Volpe P. Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Physiol Sci* 1993; 14: 98-103.
30. Neylon CB, Richards SM, Larsen MA, Agrotis A, Bobik A. Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 814-21.
31. MacLennan DH. Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys J* 1990; 58: 1355-65.
32. Inesi G, Kirtley ME. Coupling of catalytic and channel function in the Ca^{2+} transport ATPase. *J Membr Biol* 1990; 116: 1-8.
33. Kovacs T, Corvazier E, Papp B, Magnier C, Bredoux R, Enyedi A, Sarkadi B, Enouf J. Controlled proteolysis of the Ca^{2+} -ATPases in human and non-muscular cell membrane vesicles: evidence for a multiple SERCA system? *J Biol Chem* 1994; 269: 6177-84.

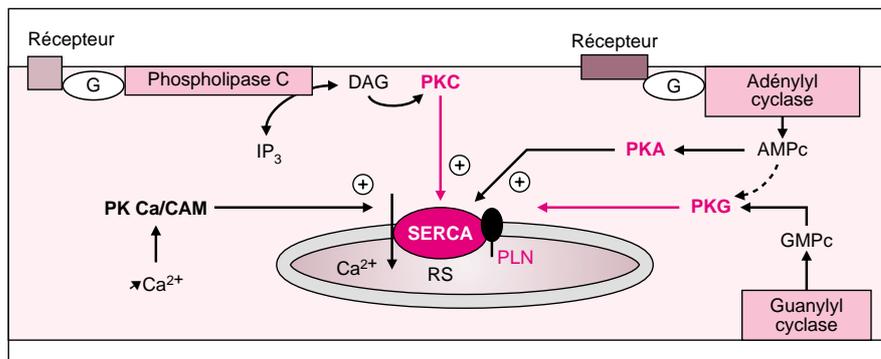


Figure 2. **Voies d'activation des pompes calciques (SERCA) du réticulum sarcoplasmique (RS).** La phosphorylation du phospholamban (PLN) active les SERCA. Le phospholamban peut être phosphorylé par quatre kinases (PKA, PKC, PKG et la Ca^{2+} /calmoduline kinase II (PK Ca/CAM)). La PKA et la PKG sont activées respectivement par l'AMP cyclique (AMPc) et le GMP cyclique (GMPc) produits lors de l'activation de l'adénylyl cyclase et de la guanylyl cyclase. La PK Ca/CAM est activée par le complexe Ca^{2+} -calmoduline formé lors de l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique. La PKC est activée par le diacylglycérol (DAG) formé en même temps que l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) par la phospholipase C. Les flèches noires représentent les voies les plus importantes dans le cœur et les flèches rouges les voies majoritaires dans le muscle lisse, où la diminution du Ca^{2+} cytosolique est plus importante sous l'effet du GMPc que de l'AMPc.

revues [16, 17]). Ces résultats indiquent donc que le réticulum est impliqué dans l'effet vasorelaxant du GMP cyclique.

Le compartiment calcique extracellulaire

La concentration en Ca^{2+} du milieu extracellulaire est d'environ 2 mM. Les canaux calciques dépendants du potentiel de type L représentent la voie principale d'entrée de Ca^{2+} dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Leur structure et leurs propriétés sont très bien décrites dans la revue de Joël Nargeot et Pierre Charnet [39]. La quantité de Ca^{2+} qui entre dans la cellule par cette voie est essentiellement déterminée par le potentiel de membrane. Cependant, des messagers extracellulaires qui modulent la contractilité agissent directement sur ces canaux (figure 3). C'est le cas de la noradrénaline, l'histamine, l'angiotensine II et l'endothéline qui augmentent la probabilité d'ouverture des canaux calciques à un potentiel donné (voir revue [10]). Dans les muscles lisses phasiques, l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques dépendants du potentiel se trouve majorée par la libération de Ca^{2+} des stocks calciques intracellu-

laires via l'activation du récepteur de la ryanodine (CICR) [40]. Ces dernières années, des mesures combinées de courants transmembranaires et de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique ont révélé l'existence d'autres voies d'entrée de Ca^{2+} dans les cellules musculaires lisses vasculaires comme l'entrée capacitive de Ca^{2+} et les canaux cationiques non spécifiques perméables au Ca^{2+} (figure 3). L'entrée capacitive de Ca^{2+} , initialement décrite dans les cellules non excitables [41], existe également dans les cellules musculaires lisses vasculaires [42]. Elle correspond à une entrée de Ca^{2+} dans la cellule consécutive à la déplétion des compartiments calciques intracellulaires. Elle est insensible aux inhibiteurs organiques des canaux calciques dépendants du potentiel et dépend uniquement de la force électromotrice pour le Ca^{2+} . Le canal responsable de cette entrée de Ca^{2+} (CRAC) possède une très faible conductance mais une grande sélectivité pour le Ca^{2+} [43]. Les hypothèses les plus récentes d'activation de ce mécanisme suggèrent une liaison protéine-protéine entre le récepteur de l'InsP₃ et ce canal calcique de la membrane plasmique [44].

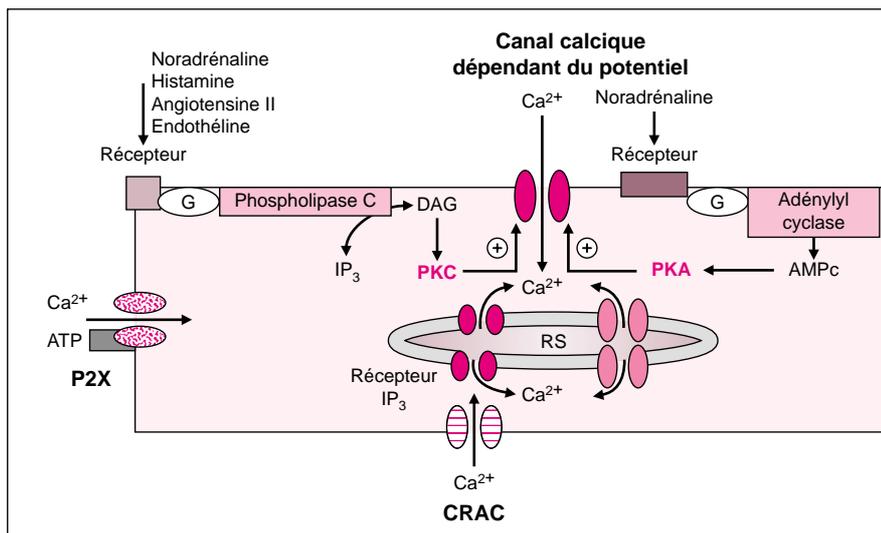


Figure 3. **Régulation des canaux calciques des cellules musculaires lisses vasculaires.** Les entrées de Ca^{2+} dans les cellules musculaires lisses vasculaires mettent en jeu des canaux calciques dépendants du potentiel dont la probabilité d'ouverture est augmentée par des mécanismes de phosphorylation impliquant les protéines kinases A (PKA) et C (PKC) activées respectivement par l'AMP cyclique (AMPc) et le diacylglycérol (DAG). L'AMPc est produit lors de l'activation de l'adénylyl cyclase et le diacylglycérol est formé en même temps que l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) par la phospholipase C. Outre ces mécanismes dépendants du potentiel, il existe des canaux calciques qui peuvent s'ouvrir au potentiel de repos. C'est le cas des récepteurs-canaux P2X activés par l'ATP extracellulaire et des canaux calciques (CRAC) sensibles à l' InsP_3 .

Le canal impliqué serait constitué de sous-unités homologues de la protéine Trp dont l'ADNc a été cloné chez la drosophile *trp* (transient receptor potential) [45]. Une famille de gènes analogues à *trp* a été identifiée chez l'homme (*HTRP1-HTRP3*) et chez la souris (*mTrp1-mTrp6*). La protéine codée par ces gènes (850 acides aminés) possède six domaines transmembranaires avec des extrémités amino et carboxy-terminales intracellulaires.

Le canal cationique perméable au Ca^{2+} le mieux caractérisé dans les muscles lisses vasculaires, est le récepteur P2X activé par l'ATP extracellulaire. Cinq types de récepteurs P2X ont vu leur ADNc cloné [46]. Les récepteurs P2X ont entre 388 et 472 acides aminés et ils ne possèdent que deux domaines transmembranaires avec des extrémités amino et carboxy-terminales intracellulaires [47]. Le sous-type de récepteur présent dans les cellules musculaires lisses vasculaires n'est pas encore caractérisé sur le plan moléculaire. Dans les cellules musculaires lisses artérielles

et veineuses, l'ouverture du récepteur-canal P2X produit un courant dépolarisant dont environ 6 % est transporté par les ions Ca^{2+} [48]. Dans les cellules veineuses, l'entrée de Ca^{2+} par le récepteur-canal P2X est suffisante pour induire un mécanisme de CICR. Par ailleurs, la dépolarisation produite permet l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel.

Variation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique est le principal déterminant de la contraction du muscle lisse vasculaire, mais il n'existe pas toujours de parfaite corrélation entre sa valeur et la force développée par le muscle. Dans le lit mésentérique, de nombreux agonistes tels que la noradrénaline, l'endothéline 1 et l'histamine produisent un niveau de phosphorylation de la myosine et une force contractile supérieurs à ceux produits en l'absence d'agoniste, à

concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique constante [10]. Cette augmentation de force induite par les agonistes constitue le phénomène de sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile. Celui-ci est particulièrement développé dans le muscle vasculaire où il constitue une voie importante de régulation de la vasoréactivité et peut être une cible potentielle pour les agents thérapeutiques. La compréhension du processus de sensibilisation au Ca^{2+} de l'appareil contractile requiert la connaissance des mécanismes moléculaires de la contraction du muscle lisse.

Mécanismes moléculaires de la contraction du muscle lisse

Dans les muscles lisses, l'interaction actine-myosine (formation cyclique des ponts acto-myosine concourant au développement de la force contractile) nécessite la phosphorylation des chaînes légères de 20 kDa de la myosine (MLC_{20}). Leur niveau de phosphorylation est déterminé par l'activité de deux enzymes à action opposée : la kinase (MLCK) et la phosphatase (MLCP) spécifiques des MLC_{20} (figure 4). La kinase MLCK, activée par un complexe 4 Ca^{2+} -calmoduline (petite protéine cytosolique de 16,7 kDa) formé lors de l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique, phosphoryle les MLC_{20} sur un résidu sérine en position 19. La phosphatase MLCP déphosphoryle ce résidu sérine et son activité est indépendante de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique. Ainsi, en présence d'une faible concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique (10^{-7} M, au repos) l'équilibre est en faveur de la phosphatase MLCP, et en présence d'une forte concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique (10^{-5} M), c'est l'activité de la kinase MLCK qui prédomine. Tout facteur capable de modifier l'activité d'une de ces deux enzymes provoquera une variation de contraction, indépendamment de la valeur initiale de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique.

Les mécanismes moléculaires de la sensibilisation induite par les agonistes ne sont pas totalement connus, mais une série de travaux récents montre que trois phénomènes essentiels sont impliqués : l'inhibition de la

RÉFÉRENCES

34. Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompré AM. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs. *FEBS Lett* 1993; 334: 45-8.
35. Le Jemtel TH, Lambert F, Levitsky DO, Clergue M, Anger M, Gabbiani G, Lompré AM. Age-related changes in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and α -smooth muscle actin gene expression in aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1993; 72: 341-8.
36. Magnier C, Papp B, Corvazier E, Bredoux R, Wuytack F, Eggermont J, Maclouf J, Enouf J. Regulation of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase during platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 1992; 267: 15808-15.
37. Levitsky DO, Clergue M, Lambert F, Souponitskaya MV, Le Jemtel TH, Lecarpentier Y, Lompré AM. Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca^{2+} -ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem* 1993; 268: 8325-31.
38. Papp B, Corvazier E, Magnier C, Kovacs T, Bourdeau N, Levy-toledano S, Bredoux R, Levy B, Poitevin P, Lompré AM, Wuytack F, Enouf J. Spontaneously hypertensive rats and platelet Ca^{2+} -ATPase: specific up-regulation of the 97 kDa isoform. *Biochem J* 1993; 295: 685-90.
39. Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Med Sci* 1994; 10: 1293-308.
40. Grégoire G, Loirand G, Pacaud P. Ca^{2+} and Sr^{2+} entry induced Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store in smooth muscle cells of rat portal vein. *J Physiol* 1993; 474: 483-500.
41. Putney JW Jr. Capacitative Ca^{2+} entry revisited. *Cell Calcium* 1990; 11: 611-24.
42. Pacaud P, Loirand G, Grégoire G, Mironneau C, Mironneau J. Noradrenaline-activated heparin sensitive Ca^{2+} entry after depletion of intracellular Ca^{2+} store in portal vein smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 3866-72.
43. Van Renterghem C, Lazdunski M. Identification of the Ca^{2+} current activated by vasoconstrictors in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1994; 429: 1-6.
44. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995; 312: 1-11.
45. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 1996; 85: 661-71.
46. Communi P, Parmentier M, Boeynaems J. Les récepteurs P2: une famille en pleine expansion. *Med Sci* 1996; 12: 614-9.

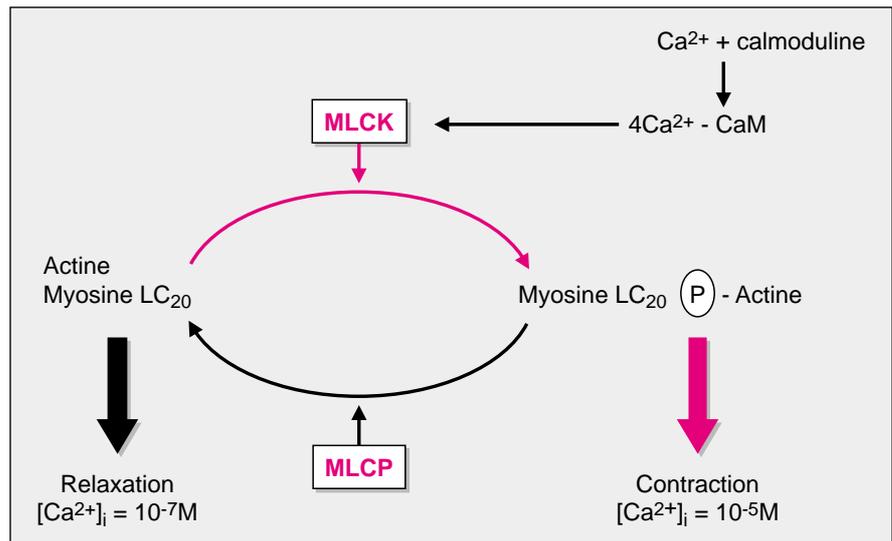


Figure 4. **Régulation de l'interaction actine-myosine dans le muscle lisse vasculaire.** La formation des ponts acto-myosine et donc le développement de la force (contraction) nécessite la phosphorylation préalable des chaînes légères de 20 kDa de la myosine (myosine LC_{20}) par une enzyme spécifique: la kinase de la myosine LC_{20} (MLCK). Cette kinase est activée par un complexe 4Ca^{2+} -calmoduline (4Ca^{2+} -CaM) formé lors de l'élévation de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique. L'extrusion et/ou le repompage du Ca^{2+} par les Ca^{2+} -ATPases inactivent la kinase MLCK et démasque l'activité de la phosphatase de la myosine LC_{20} (MLCP). Celle-ci déphosphoryle la myosine LC_{20} provoquant la dissociation des ponts acto-myosine et la relaxation. Lorsque la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique est basse (10^{-7} M, au repos) l'équilibre est en faveur de la phosphatase MLCP, lorsqu'elle est élevée (10^{-5} M), c'est l'activité de la kinase MLCK qui prédomine.

phosphatase MLCP, l'activation de protéines G et la phosphorylation de protéines régulatrices.

Inhibition de la phosphatase des chaînes légères de la myosine

L'inhibition de la phosphatase MLCP est probablement le mécanisme majeur de la sensibilisation de l'appareil contractile [1]. Plusieurs messagers intracellulaires tels que l'acide arachidonique, le diacylglycérol et la PKC sont capables de modifier l'activité de la MLCP et la force de contraction, à concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique constante. Divers agonistes sensibilisants tels que la sérotonine, la phényléphrine (agoniste α_1 -adrénergique) ou le composé U 46619 (un analogue stable du tromboxane A_2) stimulent la production d'acide arachidonique, via l'activation de la phospholipase A_2 , dans différents territoires artériels tels que les artères mésentérique, fémorale et pulmonaire [49, 50]. L'acide

arachidonique exogène induit des contractions lentes et maintenues ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation des MLC_{20} dans des fibres perméabilisées où la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique est maintenue constante. Ces effets de l'acide arachidonique sont liés à l'inhibition directe de la phosphatase MLCP par dissociation de la sous-unité catalytique du complexe régulateur [51] (figure 5). L'effet sensibilisant de l'acide arachidonique est partiellement réduit par l'inhibition de la PKC [49]. Cela suggère, qu'outre son action directe sur la MLCP, l'acide arachidonique agirait avec le diacylglycérol comme un cofacteur de la PKC (figure 5).

Implication des protéines G dans la sensibilisation de l'appareil contractile

L'effet sensibilisant des agonistes vasoconstricteurs est inhibé par le $\text{GDP}_{\beta\text{S}}$ et mimé par le GTP et le

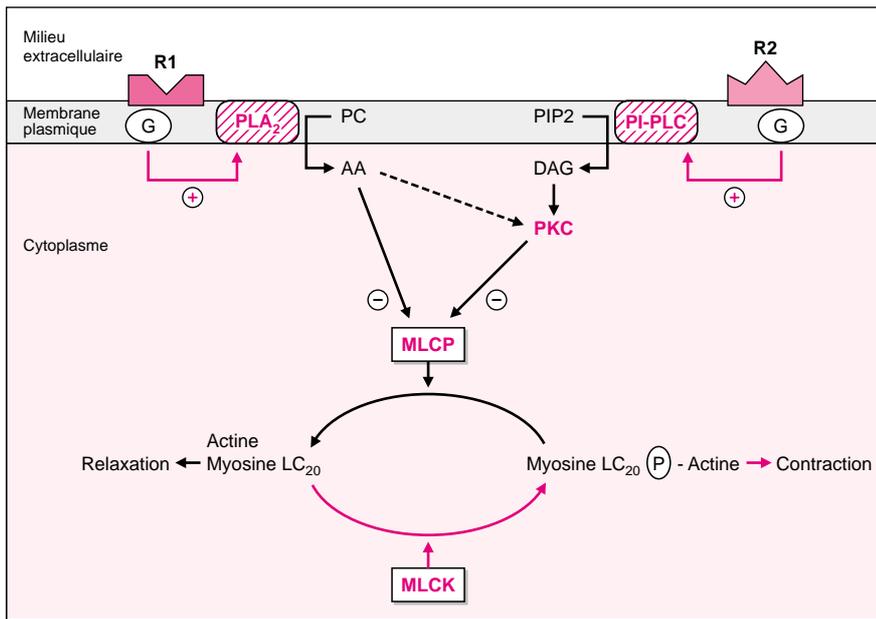


Figure 5. **L'inhibition de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP) est le mécanisme principal de l'augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile du muscle vasculaire.** La phosphatase MLCP peut être inhibée par divers messagers cellulaires tels que l'acide arachidonique (AA) et la protéine kinase C (PKC), ce qui favorise la phosphorylation de la myosine et la contraction, à concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique constante. L'acide arachidonique résulte de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) par la phospholipase A_2 (PLA_2) couplée à un récepteur membranaire (R1) via une protéine G. L'acide arachidonique pourrait également agir comme cofacteur de la PKC. Elle est activée par le diacylglycérol (DAG) résultant de l'hydrolyse du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP_2) par la phospholipase C spécifique des phosphatidylinositols (PI-PLC) couplée à un récepteur membranaire (R2) via une protéine G.

GTP γ S, ce qui suggère l'intervention de protéines G dans le mécanisme de l'augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile. Toutefois, la nature exacte des protéines G impliquées dans ce phénomène n'est pas totalement élucidée. Le fluorure d'aluminium sensibilise l'appareil contractile et son effet est inhibé par le GDP β S [52]. Ces observations plaident en faveur de l'intervention de protéines G hétérotrimériques. En outre, de nombreux agonistes sensibilisant l'appareil contractile, produisent aussi une élévation de la concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique par la voie de l'InsP $_3$, indiquant que la même protéine G (de type Gq/G $_{11}$) pourrait être à l'origine des deux phénomènes.

D'autres travaux sont en faveur de l'implication de petites protéines G (monomériques) telles que Rho p21 et Ras p21. La protéine Rho p21 est abondante dans le muscle vasculaire

et elle est impliquée dans la sensibilisation induite par le GTP γ S; son action concerne la régulation de la phosphatase MLCP [53, 54]. L'effet de Rho p21 disparaît lorsque les fibres vasculaires sont traitées par des détergents puissants (triton X 100) suggérant que l'effet sensibilisant de Rho p21 nécessiterait l'interaction de la protéine avec une membrane intacte (ou faiblement perméabilisée) et que Rho p21 serait un messager agissant en amont de la sensibilisation et non un inhibiteur direct de la phosphatase MLCP [53].

Une autre protéine G monomérique, Ras p21, est également capable d'augmenter la force de préparations vasculaires perméabilisées à concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique constante. Son effet dépend de la concentration et il est partiellement inhibé par les typhostines, indiquant l'implication des tyrosine kinases dans le processus de la sensibilisation

[55]. La protéine Ras p21 peut également être activée par la PKC ϵ , une isoforme non dépendante du Ca^{2+} de la PKC. La PKC ϵ est activée par le diacylglycérol résultant de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par une phospholipase C ou D qui en est spécifique [56].

Phosphorylation des protéines régulatrices : caldesmone et calponine*

La phosphorylation de protéines régulatrices associées aux filaments fins d'actine, telles que la caldesmone et la calponine, participe à la variation de sensibilité au Ca^{2+} de l'appareil contractile du muscle vasculaire. Ce mécanisme implique la PKC ϵ (figure 6) qui active Ras p21, convertissant alors la protéine Raf (une kinase à sérine/thréonine) de la forme inactive à la forme active. Celle-ci déclenche une cascade de phosphorylations sur les protéines-kinases activées par des mitogènes (MAP kinases) aboutissant à la phosphorylation de la caldesmone (figure 6). La caldesmone (87 kDa) est disposée de telle façon dans le filament fin qu'elle exerce une inhibition de l'activité ATPasique de la myosine. Sa phosphorylation lève cette inhibition et accroît ainsi la force contractile sans variation de concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique. Les différentes composantes de la cascade de réactions illustrées dans la figure 6 ont été démontrées dans le muscle vasculaire [57].

La calponine (34 kDa) inhibe également, par sa liaison à l'actine, l'activité ATPasique de la myosine. Elle peut être directement phosphorylée par la PKC ϵ , ce qui lève alors son effet inhibiteur et augmente la contraction [56]. Ainsi, la stimulation de la PKC ϵ par des agonistes produit une phosphorylation directe ou indirecte (par la voie des protéines Ras, Raf et MAP kinase) des protéines associées aux filaments fins du muscle vasculaire (calponine et caldesmone) et induit le développement de contractions lentes et maintenues sans variation de concentration de Ca^{2+} libre cytoplasmique (figure 6).

* Voir aussi l'article d'A. Fattoum, page 777 de ce numéro.

RÉFÉRENCES

47. Surprenant A, Buell G, North RA. P_{2x} receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci* 1995; 18 : 224-9.
48. Pacaud P, Grégoire G, Loirand G. Release of Ca²⁺ from intracellular store in smooth muscle cells of rat portal vein by ATP-induced Ca²⁺ entry. *Br J Pharmacol* 1994; 113: 457-62.
49. Gong MC, Kinter MT, Somlyo AV, Somlyo AP. Arachidonic acid and diacylglycerol release associated with inhibition of myosin light chain dephosphorylation in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 1995; 486: 113-22.
50. Parsons SJW, Sumner MJ, Garland CJ. Phospholipase A₂ and protein kinase C contribute to myofilament sensitization to 5-HT in the rabbit mesenteric artery. *J Physiol* 1996; 491: 447-53.
51. Gong MC, Fulsang A, Alessi D, Kobayashi S, Cohen P, Somlyo AV, Somlyo AP. Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J Biol Chem* 1992; 267: 21492-8.
52. Kawase T, Van Breemen C. Aluminium fluoride induces a reversible Ca²⁺ sensitization in α -toxin-permeabilized vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1992; 214: 39-44.
53. Gong MC, Izuka K, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, Sugai M, Kobayashi S, Somlyo AV, Somlyo AP. Role of guanine nucleotide-binding proteins-ras-family or trimeric proteins or both - in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1340-5.
54. Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, Takuwa Y. Involvement of rho in GTP γ S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett* 1995; 367: 246-50.
55. Satoh S, Rensland H, Pfitzer G. Ras proteins increase Ca²⁺-responsiveness of smooth muscle contraction. *FEBS Lett* 1993; 324: 211-5.
56. Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 362-8.
57. Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clément-Chomienné O, Collins EM, Morgan KG. Smooth muscle protein kinase C. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 1392-9.
58. Savineau JP, Marthan R. Diosmin-induced increase in sensitivity to Ca²⁺ of the smooth muscle contractile apparatus in the rat isolated femoral vein. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 978-80.

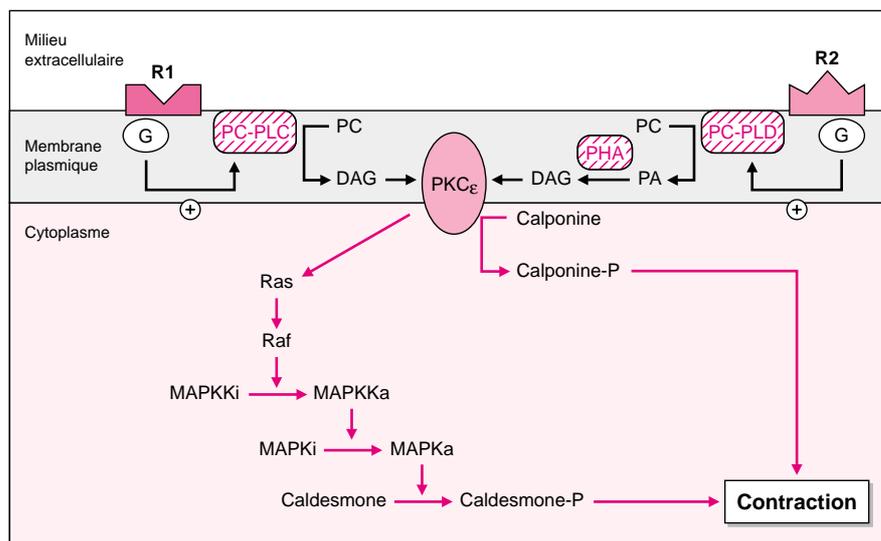


Figure 6. **Rôle des protéines régulatrices du filament fin, caldesmone et calponine, dans le contrôle de la sensibilité au Ca²⁺ de l'appareil contractile du muscle vasculaire.** La phosphorylation de la caldesmone et de la calponine lève l'inhibition qu'elles exercent sur l'activité ATPasique de la myosine et augmente ainsi la contraction, à concentration de Ca²⁺ libre cytoplasmique constante. La calponine est directement phosphorylée par la PKC ϵ , la caldesmone l'étant indirectement via l'activation d'une protéine G monomérique Ras p21 (Ras) qui stimule la protéine Raf, déclenchant la phosphorylation séquentielle des protéine kinases activées par des mitogènes (MAP kinases: MAP kinase kinase inactive (MAPKKi) et active (MAPKKa); MAP kinase inactive (MAPKi) et active (MAPKa)). La PKC ϵ est activée par le diacylglycérol (DAG) provenant, d'une part de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) par la phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine (PC-PLC), et d'autre part, de la conversion de l'acide phosphatidique (PA) sous l'action de la phosphatidate phosphohydrolase (PHA). L'acide phosphatidique résulte de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la phospholipase D (PC-PLD). Les phospholipases sont couplées à des récepteurs (R1 et R2) via des protéines G.

Conclusions-perspectives

Les antagonistes des canaux calciques de type L sont largement utilisés en clinique dans le traitement de l'hypertension, et la diversité des mécanismes impliqués dans la régulation de la contractilité vasculaire laisse entrevoir de nouvelles perspectives. Cependant, la modulation pharmacologique des différentes structures ou mécanismes impliqués dans le contrôle de la vasomotricité nécessite la caractérisation moléculaire des isoformes spécifiques des cellules musculaires lisses vasculaires. Ces travaux ne font que commencer. Les canaux ioniques dépendants du Ca²⁺ et les compartiments calciques intracellulaires, du fait de leur importance dans la régulation du potentiel de membrane, représentent des cibles pharmacologiques potentielles. Ainsi, des inhibiteurs spécifiques des canaux Cl_{Ca} ou des molé-

cules ouvrant des canaux K_{Ca} pourraient constituer des agents thérapeutiques intéressants. Par ailleurs, la sensibilisation au Ca²⁺ de l'appareil contractile est une composante importante de la réponse vasoconstrictrice aux agonistes physiologiques. Des progrès significatifs ont été récemment réalisés dans la compréhension de ce phénomène qui implique probablement de nombreuses voies de transmission du signal cellulaire, variables d'un agoniste à l'autre. La modulation pharmacologique de ce processus peut représenter une nouvelle approche thérapeutique des maladies vasculaires comme l'a montré une étude récente sur la sensibilité au Ca²⁺ de l'appareil contractile veineux [58] ■

TIRÉS À PART

P. Pacaud.

* **GLOSSAIRE** *

CML: cellule(s) musculaire(s) lisse(s).
Canaux Cl_{Ca} : canaux Cl dépendants du Ca^{2+} .
Canaux K_{Ca} : canaux K^+ dépendants du Ca^{2+} .
PKA: protéine kinase activée par l'AMP cyclique.
PKG: protéine kinase activée par le GMP cyclique.
PKC: protéine kinase C.
NO: monoxyde d'azote.
InsP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate.
CICR: Ca^{2+} induced Ca^{2+} release.
SERCA: Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique.
MLC₂₀: chaînes légères de 20 kDa de la myosine.
MLCK: kinase des chaînes légères de 20 kDa de la myosine.
MLCP: phosphatase des chaînes légères de 20 kDa de la myosine.
MAPK: kinases activées par des mitochondriens.

■ **7th International Conference on Environmental Mutagens** ■
(ICEM 97)

Toulouse, 7-12, September 1997

Programme

Metabolism of mutagens and chemical carcinogens • Structure activity relationship in carcinogenesis and mutagenesis: what is their true role and value? • Mismatch repair, replication fidelity and cancer • Base excision repair • Nucleotide excision repair and transcription • Cell cycle and repair • Chromatin and DNA repair • Induced responses to genotoxic stress • DNA recombination, transposition, amplification • Radiation sensitivity, recombination and repair • Ionizing radiation and mechanism of genetic instability • Mutational signatures of known environmental carcinogens • Germ line mutations in mammals and risk evaluation • Identification and evaluation of environmental mutagens, ecogenotoxicology • New mutagenicity tests and their evaluation • Transgenic model for studying environmental mutagenesis • DNA adduct and human cancers • Role of oxidative damage, mutagens and antimutagens in relation to nutrition • Biological consequences of sun exposure • Regulations update and industrial views. Round table discussion.

Renseignements

Europa Organisation
5, rue Saint-Pantaléon, BP 844,
31015 Toulouse Cedex 6, France.
Fax: + 33 5 61 21 28 54/57
Email: europa@dialup.francenet.fr

Summary

Intracellular signalling and vascular tone

The main function of vascular smooth muscle tissue is the regulation of blood pressure through changes in the vascular tone. Two main factors regulate the contraction and relaxation of vascular smooth muscle cells: the cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and the Ca^{2+} sensitivity of the contractile elements. Schematically, constrictors increase $[Ca^{2+}]_i$ and the Ca^{2+} sensitivity of contractile apparatus while relaxant agonists have opposite effects. The sources of Ca^{2+} are both extracellular and intracellular. The sarcoplasmic reticulum (SR) is the physiological intracellular source of Ca^{2+} . The Ca^{2+} storage capacity of SR involves intraluminal Ca^{2+} binding protein such as calsequestrin and calreticulin. Ca^{2+} is released from SR to the cytosol through InsP₃ and ryanodine receptors (InsP₃-induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release). During relaxation, the $[Ca^{2+}]_i$ is reduced in part by Ca^{2+} pumping into the SR by Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Several isoforms of SERCA are expressed in vascular smooth muscle. Ca^{2+} enters into vascular smooth cells through Ca^{2+} permeable ion channels. The capacitative Ca^{2+} entry and ligand-gated channels (P_{2x} -purinoceptors) allow extracellular Ca^{2+} to flow into the cytosol. However, voltage-dependent Ca^{2+} channels represent the main route for Ca^{2+} entry which is essentially modulated by the membrane potential. Ca^{2+} -activated channels such as Cl^- (Cl_{Ca}) or K^+ (K_{Ca}) channels play a key role in the modulation of membrane potential. Activated Cl_{Ca} channels depolarize whereas activated K_{Ca} channels hyperpolarize the membrane thus causing increase and decrease in the vascular tone, respectively. Modulation of the force at constant $[Ca^{2+}]_i$ results from changes in the activities of kinases and phosphatases, acting on the regulatory light chain of myosin (MLC₂₀) phosphorylation. Intracellular messengers such as arachidonic acid or protein kinase modulate the activity of the MLC₂₀ phosphatase and thus, the Ca^{2+} sensitivity. G protein-coupled Ca^{2+} sensitization also involves inhibition of the MLC₂₀ phosphatase. Trimeric as well as monomeric G proteins (Rho p²¹, Ras p²¹) seem to be responsible for this mechanism. Recent studies, by identifying new regulatory mechanisms, provide a better understanding of the fundamental mechanisms regulating contractile properties of vascular smooth muscle and open new way for the treatment of vascular diseases.