

wine polyphenols in vascular protection, mediates its action via direct activation of ER-alpha receptor. Both 17-beta estradiol and the specific ER-alpha agonist, propyl pyrazole triol (PPT), induced endothelium-dependent relaxation in aorta from ovariectomized female ER-alpha wild type but not in ER-alpha knock out mice. In the following experiments, 17-beta estradiol, PPT and delphinidin were used at maximally active concentrations at which they produced endothelium-dependent relaxation. ER- $\alpha$  deletion abrogated the endothelial relaxation to delphinidin. In human endothelial cell line, Eahy 926, both 17-beta estradiol (10  $\mu$ m) and PPT (10  $\mu$ m) were able to increase nitric oxide (NO) production evaluated by electron paramagnetic resonance. Interestingly, the specific ER-alpha antagonist, fulvestrant (30 nM), did not affect basal NO level but it completely prevented the response to 17-beta estradiol and PPT. Besides, the capacity of delphinidin (10  $\mu$ g/ml) in increasing NO production was blunted when ER-alpha was inhibited either pharmacologically with fulvestrant or after depletion of ER-alpha receptor with siRNA. Western blot analysis showed that 17-beta estradiol, PPT and delphinidin increased interaction between ER-alpha, caveolin-1 (Cav-1) and c-Src, and enhanced phosphorylation of Cav-1, c-Src, P42/44 MAPkinase and endothelial NO synthase (eNOS) in endothelial cells. Antagonizing ER-alpha with fulvestrant or depletion of endogenous ER-alpha with siRNA completely abolished 17-beta estradiol-, PPT- and delphinidin-induced phosphorylation of Cav-1, c-Src, P42/44 MAPkinase and eNOS. Finally, delphinidin induced 73% inhibition of specific binding of ER-alpha agonist flouligand using in vitro human ER-alpha receptor binding assay. Altogether, we provide direct evidence that delphinidin activates ER-alpha receptor and stimulates the interaction of this receptor with Cav-1, c-Src, P42/44 MAPkinase and eNOS to induce NO production in endothelial cells. Thus, ER-alpha activation is probably involved in the therapeutic benefit of delphinidin in cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction.

J024

### ROLE DU COMPLEXE PROTEIQUE ERM DANS LA TRANSMISSION DES EFFETS DE L'ACTIVATION DE L'ECHANGEUR NHE1 EN REPONSE A L'ACIDIFICATION DES MYOCYTES CARDIAQUES

A. DARMELLAH-REMIL<sup>1</sup>, C. RUCKER-MARTIN<sup>1</sup>, D. FEUVRAY<sup>1</sup><sup>1</sup> Université Paris-Sud 11 & CNRS UMR 8162, Le Plessis-Robinson, France

Nous avons étudié le rôle du complexe protéique ezrine/radixine/moésine (ou complexe ERM, relié au cytosquelette) dans la transmission du signal donné par l'augmentation d'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, NHE1, en réponse à une acidification intracellulaire. L'étude a été réalisée sur myocytes ventriculaires gauches isolés de cœurs de rats adultes (rats Wistar témoins et rats diabétiques GK). La détection des protéines ERM actives (i.e. phosphorylées) par immuno-marquage a permis de révéler que, dans les conditions basales et en dehors de toute stimulation, ces protéines sont localisées au niveau des disques intercalaires, aussi bien dans les myocytes de rats témoins que de rats GK. L'acidification entraîne une augmentation significative de la phosphorylation des protéines ERM avec remodelage intracellulaire de ces protéines; elles sont alors localisées à proximité des récepteurs de la ryanodine, vraisemblablement au niveau des tubules-T. Ces observations ont été faites aussi bien dans les cardiomyocytes ventriculaires de

rats témoins que de rats diabétiques GK, avec un remodelage plus marqué chez ces derniers. Un autre résultat d'importance est l'observation d'une augmentation d'activité de Akt, parallèle à celle du complexe ERM : augmentation avec l'acidification et absence d'augmentation lorsque l'acidification a été induite en présence d'un inhibiteur de NHE1. De plus, l'exploration de deux voies cibles de Akt, la voie mTOR/p70S6K et la voie GSK-3 $\beta$ , a montré que seule la phosphorylation de la GSK-3 $\beta$  est augmentée lors d'une stimulation marquée de l'activité de la voie NHE1/ERM/Akt. L'ensemble de ce travail, nous a permis de mettre en évidence qu'une activité élevée de l'échangeur NHE1 constitue un signal capable d'enclencher, via le complexe protéique ERM, une cascade d'événements intracellulaires pouvant notamment aboutir, comme montré précédemment<sup>1</sup>, à une réponse hypertrophique. Ceci nous semble être un résultat fondamental qui met en lumière un rôle important de NHE1, lorsque celui-ci est sollicité de façon excessive (par exemple au cours d'une ischémie chronique), à côté de son rôle reconnu de mécanisme majeur de régulation du pH interne des cellules.

<sup>1</sup>Darmellah A et al. *Diabetologia* 2007; 50 : 1335-1344.

J025

### ENDOTHELIUM-SPECIFIC CALCIUM-ACTIVATED POTASSIUM CHANNELS: TARGETS FOR ALDOSTERONE

V. GRIOL-CHARHBILI<sup>1</sup>, A. NGUYEN DINH CAT<sup>1</sup>, G. PALAIS<sup>1</sup>, L. LOUFRANI<sup>2</sup>, D. HENRION<sup>2</sup>, N. FARMAN<sup>1</sup>, F. JAISSER<sup>1</sup><sup>1</sup> Inserm U872 eq1, Paris, France<sup>2</sup> UMR CNRS 6188, Angers, France

To define the vascular role of aldosterone and the mineralocorticoid receptor (MR) in cardiovascular pathophysiology, we generated a conditional transgenic mouse model that allows a spatio-temporal control of MR expression in vivo. To specifically assess the role of MR in the vessels, MR over-expression has been achieved in endothelial cells, using the tetracycline conditional system and an endothelium-specific promoter (VE-Cadherin).

We previously described increase sensitivity to vasoconstrictors (phenylephrine, endothelin-1, thromboxane-A<sub>2</sub>, angiotensin II) in mesenteric arteries such as in aorta of mice over-expressing the MR in the endothelium (MR-EC) in presence of a normal relaxation to vasodilators (acetylcholine, bradykinin, nitroprusside). In vivo, blood pressure (BP) was increased in awaked MR-EC mice, as compared to the controls (CT) (tail-cuff method).

We have investigated, using pharmacological antagonists, the role of the small (SKCa), and the intermediate (IKCa) and the big (BKCa) conductance potassium channels in vascular function. In infra-renal aorta, endothelial SKCa and IKCa channel blockade (Apamin 1  $\mu$ m + TRAM-34 1  $\mu$ m) unmasked an impaired relaxation to acetylcholine in MR-EC mice as compared to controls. Inhibition of the smooth muscle specific BKCa channel with Iberiotoxin (0.1  $\mu$ m) blunted the higher phenylephrin-induced contractile response observed in MR-EC as compared to CT. Taken together, these pharmacological data suggest that endothelial MR overexpression is associated with an increased activity of EDHF-mediated endothelial Ca-activated K channels and a functional decrease of the smooth-muscle BKCa channel activity. Western-blot analyses when then performed to analyze the protein expression levels of the various channel subunits of the endothelial SK3 and IK and smooth-muscle BK