
RÉPONSE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES VASCULAIRES À L'APPLICATION DE CONTRAINTES MÉCANIQUES: LA MÉCANO-TRANSDUCTION*

Vénus Labrador, Sylvaine Muller, Jean-François Stoltz

Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR-CNRS 7563 (UHP-Nancy 1) et équipe IFR 111 «Bioingénierie», Faculté de Médecine, 545005 Vandoeuvre les Nancy, BP 184, France

RÉSUMÉ

L'endothélium vasculaire est une interface sensible aux contraintes mécaniques appliquées à sa surface (contraintes de cisaillement, d'étirement ou de pression) et ses différentes réponses participent à la régulation de la vasomotion et à la fonctionnalité de la paroi vasculaire via des processus de mécano-transduction.

Les nombreuses molécules présentes à la surface des cellules endothéliales (intégrines, canaux ioniques, récepteurs couplés aux protéines G et récepteurs tyrosine kinase,...) sont des candidats idéaux de réponse primaire au flux car elles sont en contact direct avec le sang circulant. Elles peuvent être activées directement par un déplacement physique ou indirectement par transfert de gradients. Ces mécano-récepteurs peuvent générer des cascades biochimiques grâce à des seconds messagers. Une autre voie de transduction du signal induit par le flux est liée à l'interaction des mécanorécepteurs activés par le flux avec les éléments cytosquelettiques.

Les réponses endothéliales aux contraintes sont très variables en fonction du temps: de la seconde à plusieurs heures après la stimulation.

ABSTRACT

Endothelium responds to mechanical stresses by a process of mechano-transduction to regulate vasomotion and function of the vascular wall.

Molecules at the luminal cell surface (integrins, ion channels, G-protein linked receptors and tyrosine kinase receptor) are candidate flow sensors since they are in direct contact with the flowing blood. These molecules can be activated directly by a physical displacement or indirectly by mass transfer gradients. They can generate a biochemical cascade either by second messengers or interactions of activated mechano-receptors with cytoskeletal elements.

Endothelial cells responses can be classified by their time-response (from a second to several hours).

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. Les recherches réalisées depuis une vingtaine d'années en biologie vasculaire ont changé le regard porté sur l'athérosclérose.

L'observation des lésions athéromateuses montre que l'environnement hémodynamique local, en particulier les contraintes de cisaillement pariétales, est un facteur de première importance pour expliquer l'athérogénèse. En effet, des variations des conditions hémodynamiques peuvent induire des modifications fonctionnelles des cellules soumises à ces variations telles que les éléments figurés du sang ou l'endothélium vasculaire.

On sait aujourd'hui que l'endothélium vasculaire est un interface sensible aux contraintes mécaniques et joue le rôle d'acteur principal dans les processus de transduction du signal afin de réguler la fonctionnalité de la paroi vasculaire. Ces contraintes sont générées par le fluide en écoulement dans la lumière du vaisseau

(contraintes de cisaillement) et par la déformation du conduit (contraintes élongationnelles). Restent à identifier les mécanismes qui conduisent des stimuli mécaniques aux réponses de la cellule endothéliale: s'agit-il d'une activation mécanique des canaux ioniques, du contrôle du transport moléculaire par la contrainte de cisaillement, ou de ces différents phénomènes associés...? existe-t-il des capteurs de déformation dans la paroi, des récepteurs membranaires sensibles au cisaillement...?

Les diverses réponses endothéliales peuvent être classées en temps de réaction, bien qu'elles soient souvent simultanées. Par exemple, les changements rapides du potentiel membranaire (de l'ordre de la seconde) et l'activation ou la libération de certains médiateurs vasoactifs apparaissent beaucoup plus tôt que les modifications de la morphologie cellulaire dans la séquence des événements de mécano-transduction. De plus, les CE montrent une grande variation dans la réponse des fonctions cellulaires et

malgré le nombre de travaux publiés dans différentes conditions (*in vivo* ou *in vitro*, durée expérimentale, etc.) et sur divers modèles cellulaires, la connaissance de ces phénomènes reste incomplète.

I. Forces hémodynamiques agissant sur la paroi vasculaire

In vivo, la cellule endothéliale (CE) est soumise à 3 types de contraintes mécaniques (Fig. 1) dont l'intensité est variable en fonction du lit vasculaire: la contrainte de cisaillement (τ , quelques mPa), la pression hydrostatique (p , quelques Pa) et la déformation pariétale périodique (ϵ , 0 à 3 Hz) (Charara 1993, Gooch et Tennant 1997).

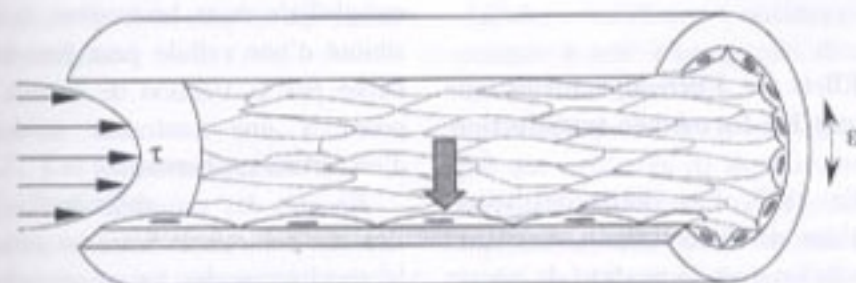


Fig. 1 – Contraintes mécaniques agissant sur les CE: τ : contrainte de cisaillement, p : pression hydrostatique, ϵ : déformation pariétale périodique.

I.1. Contrainte de cisaillement

La contrainte de cisaillement est développée par l'écoulement sanguin et agit tangentiellement sur les CE. La contrainte de cisaillement à la paroi, τ , est généralement calculée par la relation de Poiseuille en prenant comme hypothèse l'écoulement stationnaire d'un fluide newtonien dans une

conduite cylindrique suffisamment longue:

$$\tau = 4 Q \mu / \pi r^3$$

où Q est le débit, μ la viscosité dynamique du sang et r le rayon interne du vaisseau.

I.2. Pression hydrostatique

La pression hydrostatique agit perpendiculairement à la surface de l'endothélium. Elle agit aussi bien sur la matrice extracellulaire que sur l'endothélium.

A l'échelle macroscopique, l'écoulement du sang dans les artères est généralement laminaire. Cependant, la géométrie des vaisseaux à proximité des singularités vasculaires (bifurca-

tions, anévrismes, sténoses et régions de courbure) prédispose à la séparation de l'écoulement et à l'apparition de tourbillons. Dans ces régions, la contrainte de cisaillement et la pression présentent des grandes fluctuations en amplitude et en direction sur de faibles distances.

A l'échelle microscopique, il faut également noter que la distribution de

la contrainte de cisaillement et de la pression à la surface de chaque CE ne sont pas uniformes et sont fonction de la topographie de la surface cellulaire.

1.3. Déformation périodique

En plus de la contrainte de cisaillement et la pression, l'endothélium artériel est exposé à une déformation périodique de la paroi correspondant aux pulsations cardiaques.

La déformation classiquement mesurée est la déformation circonférentielle, c'est-à-dire la variation de diamètre (interne et externe):

$$\varepsilon = (D - D_0) / D_0$$

ε : déformation (%), D et D_0 , les diamètres de paroi lors de la systole et de la diastole ventriculaire.

II. Effets de l'hémodynamique sur les CE – La mécano-transduction

En 1968, Fry décrit des modifications de l'endothélium vasculaire en relation avec le gradient de vitesse pariétal (Fry 1968). En 1981, Dewey et col. parlent d'une réponse dynamique des CE vis-à-vis des forces de cisaillement (Dewey et col. 1981) et Nerem et col. suggèrent que la morphologie des CE peut être un indicateur de la condition hémodynamique locale (Nerem et col. 1981). Au cours des dix dernières années, l'influence des conditions hémodynamiques locales sur les CE a suscité un intérêt croissant. Les travaux les plus récents ont souligné le rôle déterminant des conditions locales d'écoulement sur

leurs propriétés (Reinhart 1994, Davies et col. 1997-a, Ballermann et col. 1998). Ces modifications sont décrites sous le terme général de mécano-transduction. Actuellement, on admet que l'endothélium est une interface sensible aux contraintes de cisaillement et joue le rôle d'acteur principal dans les processus de la transduction du signal afin de réguler la vasomotion et la fonctionnalité de la paroi vasculaire (Davies et col. 1997-b).

III.1. Distribution de contraintes mécaniques

Il est admis que les variations de la distribution de contrainte de cisaillement peuvent aider à expliquer les différentes réponses endothéliales aux écoulements. La monocouche endothéliale étant hétérogène, la sensibilité d'une cellule peut être déterminée par la fraction de surface exposée à une contrainte au-dessus d'un certain seuil critique.

En plus des variations de distribution des contraintes entre les cellules, la distribution des forces subcellulaires est variable dans l'espace. Dans ce cas, la localisation des éléments mécano-sensibles à la surface cellulaire est un facteur clé.

De ce point de vue, on peut imaginer que la sensibilité d'une cellule est déterminée par sa forme ainsi que par la localisation et l'activation de ses éléments mécano-sensibles.

Si on accepte l'hypothèse de la présence de récepteurs sensibles au flux répartis à la surface membranaire, leur distribution devient alors un facteur important: un récepteur membra-

naire sera sensible à l'écoulement selon qu'il se trouve ou non dans une zone de contraintes élevées. Par conséquent, un écoulement particulier peut ne pas provoquer une réponse cellulaire si ses récepteurs sont localisés dans une zone où la contrainte est inférieure à un certain seuil (Satcher et col. 1992, Barbee et col. 1995, Davies et col. 1997-a et b).

La réponse des CE à des stimuli mécaniques concerne pratiquement tous les mécanismes liés à la croissance et au métabolisme cellulaire. Tous les produits dérivés de l'endothélium sont régulés par les contraintes mécaniques développées par l'écoulement sanguin, via un phénomène de "mécano-transduction". Mais les mécanismes restent souvent hypothétiques: comment et par quels "capteurs" les CE reçoivent-elles les stimuli mécaniques et les convertissent-elles en des signaux biochimiques?

II.2. Les mécano-récepteurs potentiels

Les molécules présentes à la surface luminale cellulaire sont les candidats idéaux car elles sont en contact direct avec le sang circulant. Ces molécules peuvent être activées directement par un déplacement physique (changement conformationnel) ou indirectement par transfert de gradients (qui changent les interactions ligand-récepteur) (Davies et Tripathi 1993, Nollert et col. 1991). Ces structures membranaires ou mécano-récepteurs incluent les intégrines, les canaux ioniques, les protéines G liées aux récepteurs et les récepteurs tyrosine kinase (Davies 1995).

Ces mécano-récepteurs peuvent générer des cascades de réponse du côté cytoplasmique de la membrane plasmique, grâce à des seconds messagers biochimiques (mode centralisé de la mécano-transduction). Ainsi l'activation des protéines kinases est suivie de la stimulation de facteurs de transcription cytosolique, et/ou de la régulation de la transcription génique au niveau du noyau (Patrick et McIntire 1995).

Une autre voie de transduction du signal induit par les contraintes de cisaillement est liée à l'interaction des mécanorécepteurs, activés par le flux, avec les éléments cytosquelettiques. En utilisant un mode "décentralisé" de mécano-transduction, la transmission du signal peut se faire via des connexions avec le cytosquelette (sites d'adhésion focale, jonctions cellule-cellule, membrane nucléaire) et conduit à une plus grande diversité des réponses cellulaires.

Certaines de ces réponses générées par des molécules de signalisation intracellulaire (seconds messagers) sont rapides, de l'ordre de la seconde ou de la minute. D'autres réponses se développent dans les heures suivant la naissance du signal.

a) Les intégrines

Les intégrines sont responsables de l'adhésion cellulaire et de la migration sur la matrice extracellulaire. Via leurs interactions avec d'autres molécules, elles entrent dans la modulation de l'organisation du cytosquelette tout comme la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Elles sont

largement impliquées dans la régulation du développement embryonnaire, l'apoptose, l'hémostase, le recrutement et l'activation des leucocytes et la rétraction du caillot sanguin. Certaines ont, de plus, un rôle significatif dans la croissance des tumeurs cellulaires et des métastases.

Lors de leur liaison aux intégrines, les ligands se lient fermement ou regroupent les intégrines en se liant aux intégrines adjacentes à la surface cellulaire. La liaison ou le regroupement des intégrines conduit à la formation de points focaux d'adhésion ou les intégrines se lient à des complexes cytosquelettiques intracellulaires et indirectement aux filaments d'actine.

Le déplacement d'une intégrine transmembranaire pourrait communiquer la force au cytosquelette à travers des liens protéine/protéine du côté cytoplasmique de la membrane. Par exemple, le récepteur de matrices extracellulaires, l'intégrine β_1 , peut induire une formation d'adhésion focale induisant un signal contrainte-dépendant. La rigidité du cytosquelette augmenterait avec la contrainte appliquée, ce qui nécessiterait des microtubules intacts ainsi que des filaments intermédiaires et des microfilaments (Wang et col. 1993).

A la suite de cette liaison ferme des intégrines à leurs ligands, elles "intègrent" les signaux extérieurs donnés par les autres cellules ou les composants de la matrice extracellulaire auxquelles elles adhèrent, signaux qu'elles transmettent à l'intérieur de la cellule en s'associant par leur domaine intracellulaire au cytosquelette et en déclenchant des signaux de transduction.

Les signaux de mécanotransduction conduisent à l'hydrolyse des phospho-inositols et donc à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, à la phosphorylation de plusieurs protéines, notamment l'activation de la tyrosine kinase de l'adhésion focale (pp125^{FAK}) et à l'induction de différents gènes.

L'application d'une contrainte de cisaillement sur les CE provoque l'activation rapide des protéines kinases dont ERK (extracellular signal-regulated kinase) et JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Li et col. 1996). Cela fait partie de l'activation transcriptionnelle des gènes précoces tels que ceux codant pour MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) et c-fos (Shyy et col. 1994, Jalali et col. 1998). Ces activations sont modulées par la protéine Ras elle-même régulée par la protéine Sos (Son of sevenless). Cependant, en réponse à de nombreux facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet derived growth factor) ou l'EGF (Epidermal growth factor), la protéine adaptatrice Shc (Src homology2/alpha collagen) est phosphorylée au niveau de ses tyrosines et s'associe avec les phospho-tyrosines du récepteur Tyrosine Kinase par le domaine SH2 (Src homology domain-2). Après phosphorylation, elle peut aussi s'associer à la protéine Grb2 (Growth factor receptor-binding protein-2) par le domaine SH2. L'assemblage Shc-Grb2-Sos fournit donc une voie alternative de signalisation à la voie Grb2-Sos utilisée par la protéine Ras.

Récemment il a été montré que la protéine Shc est impliquée dans les signaux de transduction. En effet, chez les cellules A341, il a été montré

que Shc est associée aux intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, et $\alpha_5\beta_3$. Cette étude a mis en évidence également que Shc est nécessaire et suffisant à l'activation de ERK en réponse à la liaison des intégrines. Les expériences de co-immunoprécipitation et de mutagenèse ont prouvé que le recrutement de Shc est spécifique au domaine extracellulaire ou transmembranaire de la sous-unité α de l'intégrine. Ces résultats suggèrent que les facteurs de croissance et les intégrines peuvent réguler la voie d'activation de ERK via Shc et par extension que l'association d'intégrines spécifiques avec Shc régule la survie cellulaire (Wary et col. 1996).

b) Les canaux ioniques

La double couche lipidique des membranes cellulaires a une haute perméabilité pour les molécules polai-

res de petite taille et les molécules hydrophobes tandis qu'elle est hautement imperméable aux ions et aux molécules chargées. Des protéines membranaires spécialisées (canaux et transporteurs) sont responsables du transfert spécifiques d'ions à travers la membrane. Ainsi de nombreux canaux recouvrent la surface luminale de l'endothélium mais il n'a pas encore été déterminé si l'activation des canaux ioniques est secondaire à l'activation des mécano-récepteurs en amont ou si elle résulte d'une altération conformationnelle des protéines dont les canaux ioniques. Les canaux ioniques et les échangeurs d'ions sont donc de potentiels mécano-récepteurs (Davies 1995) (Fig. 2).

Les canaux ioniques K^+ , sensibles à l'étirement de la membrane, voient leur activité modifiée en réponse à une contrainte mécanique. Olesen et col. ont identifié un courant K^+ sélectif activé par la contrainte de cisaillement. Ce

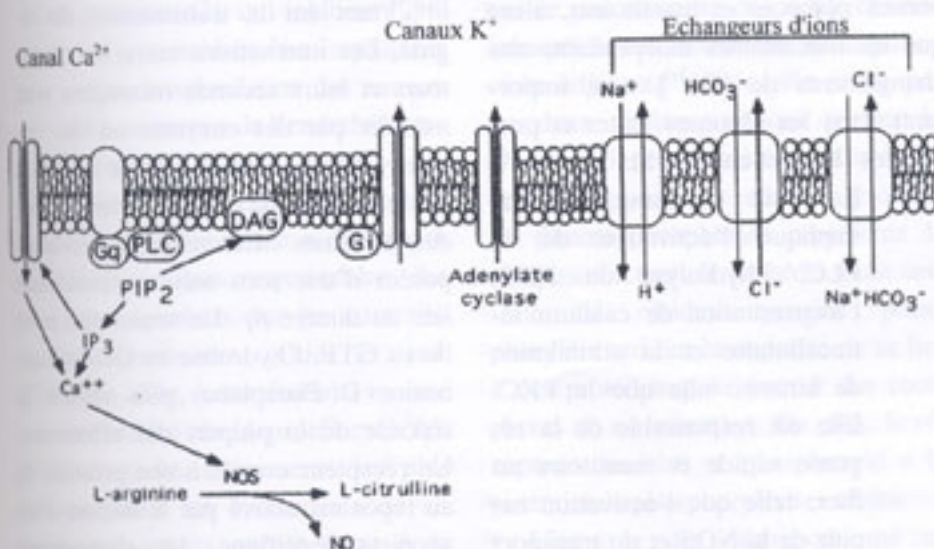


Fig. 2 - Représentation schématique du rôle des canaux ioniques et des échangeurs d'ions en tant que mécano-transducteurs potentiels (d'après Papadaki et Eskin 1997).

courant membranaire hyperpolarisant se développe en fonction de la contrainte de cisaillement, atteignant la moitié de son maximum d'activation à 0,7 dynes/cm² et la saturation à 15-20 dynes/cm². Il est rapidement activé par la contrainte de cisaillement (quelques secondes), augmente lentement (quelques minutes), et un retour complet à la normale est observé quand l'écoulement est arrêté (Olesen et col. 1988). Néanmoins, il n'est pas sûr que l'activation de ces canaux soit une réponse primaire à la contrainte de cisaillement.

De même, de nombreux canaux et échangeurs d'ions sont utilisés par le calcium. L'influx de calcium peut activer de nombreuses voies de signalisation en aval, dont une qui stimule notamment la production de NO et par conséquent la vasodilatation des vaisseaux (Himmel et col. 1993). Il a même été proposé que les mécanismes dépendant de la concentration calcique intracellulaire pourraient jouer un rôle important dans les réponses précoces et transitoires, alors que les mécanismes indépendants des changements de $[Ca^{2+}]_i$ sont importants dans les réponses lentes et prolongées (Berk et col. 1995):

- La voie calcium-dépendante implique l'activation de la PLC, l'hydrolyse du PIP₂, l'augmentation de calcium intracellulaire et la stimulation de kinases telle que la PKC. Elle est responsable de la réponse rapide et transitoire au flux, telle que l'activation rapide de la NOS et du transport ionique. Par ailleurs, le calcium intracellulaire est crucial pour la réorganisation du cy-

tosquelette et l'alignement des CE soumises à un flux (Malek et col. 1996).

- La voie calcium-indépendante met en jeu l'activation des petites GTPases liant le GTP et la stimulation de PKC et MAP kinase calcium-indépendantes. Elle induit une réponse plus lente comme l'activation soutenue de la NOS et les changements de morphologie cellulaire et d'expression génique.

c) Les récepteurs couplés aux protéines G

La stimulation de nombreux récepteurs membranaires est retransmise par une classe de protéines spécifiques, liant le GTP (Guanosine Tri-Phosphate), appelées les protéines G. Elles opèrent le couplage des récepteurs avec les effecteurs intracellulaires, et à ce titre exercent un contrôle important sur la transmission du signal. Les interactions entre les récepteurs et leurs seconds messagers sont médiées par des enzymes ou des canaux ioniques activés par la liaison à des protéines G. Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques, composées d'une sous-unité α fermement liée au dimère $\beta\gamma$. La sous-unité α se lie au GTP, l'hydrolyse en GDP (Guanosine Di-Phosphate) puis régule la réponse de la plupart des effecteurs. Un récepteur couplé à une protéine G au repos est activé par la liaison d'un agoniste spécifique. Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur; induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange

du GDP par du GTP et donc l'activation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ intracellulaires qui vont aller réguler l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité $G\alpha$, entraîne la réassociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ et le retour à l'état initial.

L'amplification du signal porté par un modulateur extracellulaire a lieu en fait à deux niveaux; tout d'abord au niveau du récepteur activé qui peut activer de nombreuses protéines G les unes à la suite des autres; ensuite au niveau de la sous-unité α -GTP qui peut maintenir le système amplificateur activé tant que le GTP n'est pas hydrolysé en GDP.

Les protéines G se classent en trois différentes sous-classes (Simon et col. 1991):

- protéines G_q , activant la phospholipase C (PLC)
- protéines G_s , activant les canaux calciques et l'AC
- protéines G_i , qui inhibent l'AC et qui semblent être impliquées dans la stimulation des canaux K^+ au niveau de l'endothélium.

Récemment, un nouveau rôle pour les protéines G hétérotrimériques dans les voies de signalisation a été proposé. Elles seraient responsables des changements induits par les contraintes de cisaillement (Gudi et col. 1996). En effet, cette étude a montré que l'activation de la protéine G fait partie d'un des événements les plus précoces dans les événements de signalisation induits par le flux. A la suite de ces travaux, une nouvelle étude a mis en évidence des changements sélectifs et spécifiques à la na-

ture de la protéine G stimulée, corrélés avec les changements dans la signalisation du signal et la fonctionnalité de la protéine G (Redmond et col. 1998). Ainsi, les récepteurs liés aux protéines G peuvent être également considérés comme de potentiels mécano-transducteurs et, en aval, comme des éléments de signalisation (Fig. 3).

d) Les récepteurs tyrosine-kinase (RTK)

Ce sont des protéines transmembranaires qui, après stimulation, induisent des voies de signalisation. Leurs caractéristiques communes sont la présence d'un segment transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire possédant une activité catalytique de type protéine tyrosine-kinase. La liaison du ligand entraîne la dimérisation des récepteurs. La dimérisation permet à l'activité kinase portée par chacune des deux chaînes intracellulaires rencontrer la séquence cible adjacente portée elle aussi par les deux chaînes, ce qui permet la phosphorylation croisée inter-moléculaire de plusieurs résidus tyrosine. Le dimère phosphorylé représente le récepteur activé. Il possède toute une série de résidus tyrosine phosphorylés qui ont la capacité de se lier à des protéines pour former des complexes de signalisation. De plus, le récepteur dimérisé et phosphorylé a le potentiel de phosphoryler ses cibles.

L'analyse des séquences qui se lient aux récepteurs phosphorylés a montré que la plupart d'entre elles, mais pas toutes, contiennent des do-

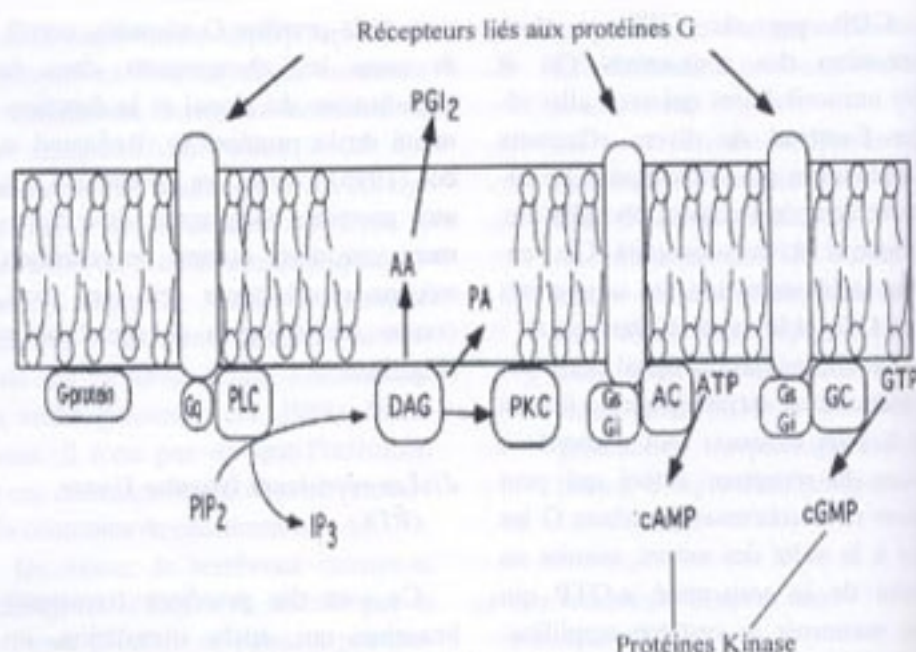


Fig. 3 - Représentation schématique des récepteurs liés aux protéines G et des signaux intracellulaires associés à leur activation par les contraintes de cisaillement (d'après Papadaki et col. 1997).

maines SH2. D'autres contiennent des domaines PTB (PhosphoTyrosine Binding Protein). En conclusion, l'assemblage des complexes de signalisation dépend du recrutement par les tyrosines phosphorylées des récepteurs de protéines possédant des domaines SH2 ou PTB. De nombreuses protéines contenant des domaines SH2 s'associent aux RTK pour former des complexes. Certaines de ces protéines sont elles-mêmes phosphorylées à l'issue de cette association.

La Fig. 4 présente schématiquement les voies de signalisation activées par les récepteurs tyrosine kinase.

En conclusion, les contraintes mécaniques activeraient des capteurs mécano-sensibles, tels que les récepteurs de surface, les canaux ioniques, les points focaux d'adhésion et le cytosquelette. Cette étape initiale se

poursuivrait ensuite au niveau des seconds messagers, tels que le Ca^{2+} intracellulaire, la protéine kinase C (PKC), la protéine G, l'Adénosine monophosphate (AMP) cyclique et la guanosine monophosphate (GMP) cyclique, etc., qui subissent à leur tour des perturbations. Ces modifications profondes de l'équilibre des seconds messagers entraîneront alors un changement de l'état d'activation des "DNA binding factors" (Hsieh et col. 1992, Morita et col. 1994, Kuchan et Frangos 1994).

L'étape finale se résume alors dans une altération de l'activité de transcription de nombreux gènes via des éléments de réponse aux contraintes de cisaillement locales tel que le Shear Stress Response Element (SSRE) positifs ou négatifs, ou une combinaison des deux, agissant à différentes étapes.

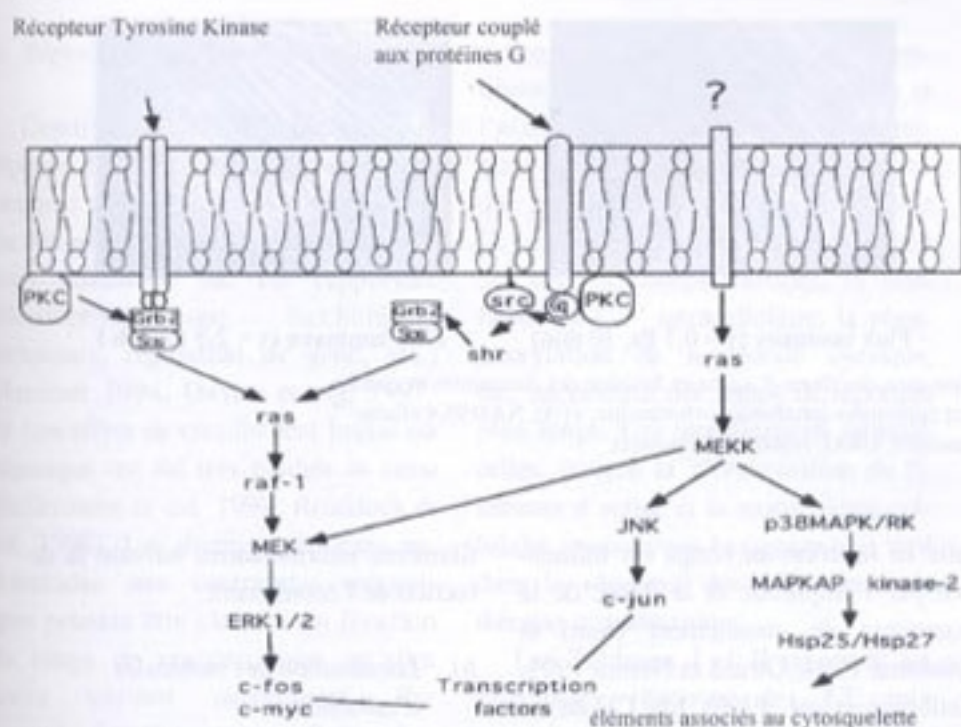


Fig. 4 - Représentation schématisée des voies de signalisation activées par les récepteurs Tyrosine-Kinase (d'après Papadaki et Eskin 1997).

II.3. Différentes réponses des CE aux contraintes de cisaillement

a) Morphologie des cellules endothéliales

Les changements morphologiques correspondant à l'allongement et à l'orientation des CE parallèlement à la direction de l'écoulement et la réorganisation de cytosquelette sont responsables de la motilité et de l'adhésion cellulaire (Dewey et col. 1981, Nerem et col. 1981, Ookawa et col. 1993, Thoumine et col. 1995, Cucina et col. 1995). A faible contrainte de cisaillement, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, les CE montrent une forme polygonale et sont moins allongées en comparaison avec des

CE soumises à une forte contrainte de cisaillement (Franke et col. 1984, Walpola et col. 1993, Drenckhahn et Ness 1997). Par ailleurs, les changements morphologiques des CE sont variables selon leur localisation dans les vaisseaux (branchements, bifurcations) et les conditions d'écoulements (laminaire, perturbé, présence de vortex, etc.) (Davies et col. 1986, Helminger et col. 1991, Sato et Ohshima 1994, Truskey et col. 1995, Chiu et col. 1998).

Tous les éléments du cytosquelette (filaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires, protéines cytosquelettaires telles que la e.g. vinculine) présentent une réorganisation lors de l'application d'une contrainte de cisaillement (Fig. 5).

Cette réorganisation du cytosque-

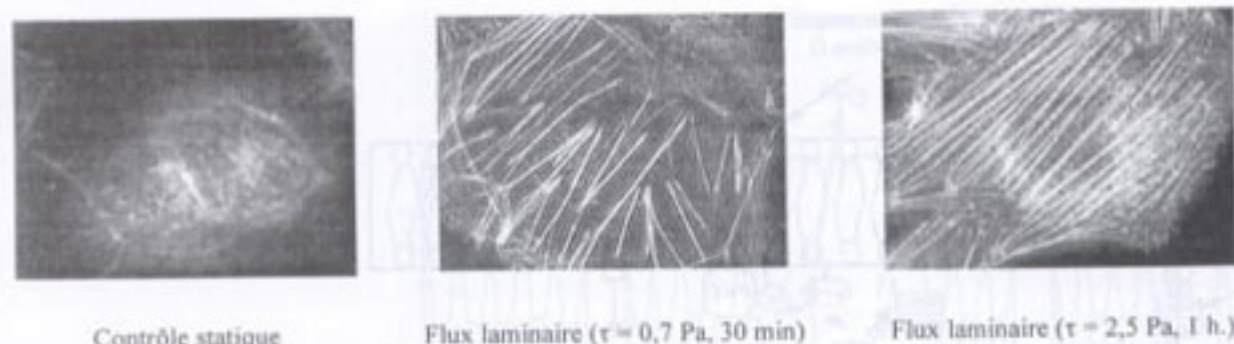


Fig. 5 – Orientation des fibres d'actine en fonction des contraintes de cisaillement appliquées (phalloïdine-rhodamine, x100, NA0.95, Cellscan™, Scanalytic, USA); *résultats personnels.*

lette en fonction du temps est influencée par l'amplitude et la durée de la contrainte de cisaillement (Sato et Ohshima 1994, Girard et Nerem 1995, Galbraith et col. 1998). Les CE au repos montrent des bandes périphériques denses (DPB), les fibres de stress se terminant dans les régions des DPB. Les vinculines sont associées aux extrémités des filaments d'actine à la périphérie et à celles des fibres de stress.

Après un cisaillement prolongé, les CE se sont allongées dans le sens de l'écoulement. Dans la cellule, de même que la redistribution des fibres de stress et des microtubules, on observe l'alignement des faisceaux de

filaments intermédiaires suivant la direction de l'écoulement.

b) Localisation des molécules d'adhésion

Nous avons observé, chez les CE, que l'activation, quelle qu'en soit la nature, entraîne une surexpression des molécules d'adhésion tel que ICAM-1, ligand des intégrines leucocytaires, favorisant ainsi l'adhésion ferme. Par ailleurs, on observe une transmigration des molécules d'ICAM-1 vers le pôle apical de la CE via le cytosquelette créant ainsi une région facilement accessible aux cellules circulantes et fortement adhésive (Fig. 6).

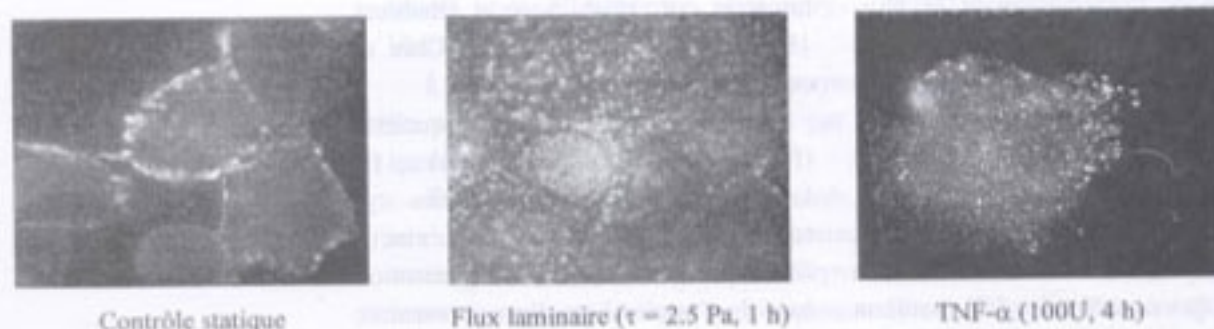


Fig. 6 – Localisation des ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales (x100, NA0.95, Cellscan™, Scanalytic, USA), (d'après Muller et col. 1999).

c) Réponses intracellulaires

Depuis une quinzaine d'années, la réponse des CE à des contraintes mécaniques a été largement étudiée et les variations d'un grand nombre de fonctions cellulaires ont été rapportées (électrophysiologique, biochimique, récepteurs, régulation de gene, etc.) (Reinhart 1994, Davies et col. 1997-2000). Les effets de cisaillement brutal ou chronique ont été très étudiés *in vitro* (Ballermann et col. 1998, Braddock et col. 1998). Les diverges réponses endothéliales aux contraintes mécaniques peuvent être classées en fonction du temps de réaction, bien qu'elles soient souvent simultanées. Par exemple, les changements électrophysi-

ologiques rapides du potentiel membranaire (de l'ordre de la seconde) et l'activation des cascades biochimiques montrent un temps caractéristique similaire. L'activation de protéine G, la libération de NO, la mobilisation des dérivés phosphoinosides, la libération de Ca²⁺ intracellulaire, la phosphorylation de nucléotide cyclique, etc, nécessitent des temps de réponses plus longs. Les modifications structurales, comme la réorganisation de filaments d'actine et la morphologie cellulaire apparaissent beaucoup plus tard dans la séquence des événements de mécano-transduction.

Les Tableaux I et II résument les principales réponses des CE aux contraintes de cisaillement pour diffé-

TABLEAU I
 Réponses précoces des CE à une contrainte de cisaillement

Temps	Réponses	Signification physiologique	Références
secondes	Activation du canal K ⁺	- ouverture des canaux K ⁺ sélectifs - favoriser l'entrée du calcium	Olesen et col. 1988
	Activation des messagers secondaires (IP ₃ , DAG, Ca ²⁺ , PKC, protéine-G, ...)	- activation de la transduction du signal (e.g. activation de la voie Ca ²⁺ -dépendante)	Prasad et col. 1993 Bhugyalakshmi et col. 1992 Shen et col. 1992 Helmlinger et col. 1995 Hsieh et col. 1992 Berthiaume et Frangos 1992 Kuchan et col. 1994
	Libération de NO	- vasorelaxation flux-dépendante	Kuchan et Frangos 1994 Gooch et Tennant 1997
minutes	Libération de NO	- vasodilatation et anti-thrombose	Frangos et col. 1985
	Activation de MAP kinase	- transduction du signal	Tseng et col. 1995
	Activation de NFκB Régulation de PDGF-B SSRE-dépendant	- activation de la transcription - régulation de la croissance cellulaire	Mohan et col. 1997 Hsieh et col. 1991

IP₃: inositol triphosphate; DAG: diacylglycerol; PKC: protein kinase C; NFκB: nuclear factor kappa B; MAP: mitogen-activated protein; SSRE: shear stress response element; PDGF-B: platelet derived growth factor B chain; bFGF: basic fibroblast growth factor beta; NO: nitric oxide; PG: prostaglandins; NOS: nitric oxide synthase; tPA: tissue plasminogen activator; TGFβ: transforming growth factor beta; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; ET-1: endothelin-1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1; Tm: thrombomodulin; Fn: fibronectin.

TABLEAU II
Réponses tardives des CE à une contrainte de cisaillement

Temps	Réponses	Signification physiologique	Références
>4 h	Régulation SSRE-dépendante (PDGF, NOS, iPA, TGF β 1, ICAM-1, c-fos, MCP-1 etc.)	- régulation de la croissance cellulaire - vasorelaxation flux-dépendante - augmentation de l'activité fibrinolytique - adhésion cellulaire - transduction du signal - recrutement de monocytes	Hsieh et col. 1991 Xiao et col. 1997 Diamond et col. 1989 Diamond et col. 1990 Ohno et col. 1992 Nagel et col. 1994 Sampath et col. 1995 Hsieh et col. 1993 Shyy et col. 1994
>6 h	ET-1: augmentation (faible cisaillement); diminution (>0.6Pa)	- vasoconstriction	Kuchan et Frangis 1993
	VCAM-1: diminution	- adhésion cellulaire	Ando et col. 1994
	Réarrangement du Cytosquelette Alignement des sites d'adhésion focale Augmentation de la connexine 43 Réarrangement des organelles cellulaires (MTOC, Golgi, etc.)	- mécanisme dans les variations de la morphologie	Galbraith et col. 1998 Davies et col. 1994 Davies 1997-b
	Prolifération cellulaire Augmentation: écoulement turbulent ou perturbé Non changement ou diminution: l'écoulement laminaire	- prolifération de CE	Davies et col. 1986 Gooch et Tennant 1997
	Changement de la morphologie (>12h) Réarrangement de F α	- adaptation au flux	Davies 1997-b Barbee et col. 1995 Wechezak et col. 1985
	Régulation négative de T α	- anti-thrombose	Malek et col. 1994
>24 h	Augmentation de la rigidité de la surface cellulaire	- diminution de la déformabilité de la surface cellulaire	Sato et col. 1987
	Alignement et élongation des CE	morphologie adaptée au flux	Girard et Nerem 1995 Galbraith et col. 1993

rents temps d'application des contraintes.

d) Régulation génique

La régulation de l'expression génique de molécules synthétisées par les CE et responsables de sa fonctionnalité, comme l'ET-1 (Morita et col. 1994), le PAF (Diamond et col. 1990), le PDGF α et β (Hsieh et col. 1991), la MCP-1 (Shyy et col. 1994), les molé-

cules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) (Nagel et col. 1994, Sampath et col. 1995, Ando et col. 1994), est influencée par l'écoulement. Par exemple, le PDGF-B et le FGF sont surexprimés dans les CE et dans les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires soumises à des forces de cisaillement. Resnà et col. ont montré que l'expression de PDGF-B dans les CE est dépendante d'une séquence de 12 nucléotides (SSRE) dans la région promotrice du gène du PDGF-B distincte de toutes les

séquences servant de site de liaison aux facteurs transcriptionnels connus. Cette même équipe a montré qu'un autre gène, particulièrement intéressant du point de vue de l'inflammation, ayant cette séquence SSRE est également surexprimé dans les CE soumises à des forces de cisaillement: il s'agit du gène codant pour ICAM-1 alors que l'expression de VCAM-1 et de ELAM-1, dont les régions promotrices sont dépourvues de la séquence SSRE, n'est pas affectée dans les mêmes conditions. Ces faits suggèrent que les SSRE pourraient être présents dans la CE et activable par des mécanismes de mécano-transduction. Les autres facteurs de transcription qui participent à l'activation de promoteurs par la contrainte de cisaillement sont le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), la protéine activatrice-1 (AP-1), le facteur de croissance précoce-1 (Egr-1) c-ias,

c-jun, c-myc et de la protéine stable 1 (Sp-1) (Resnick et Gimbrone 1995, Gimbrone et col. 1997). Les variations observées dans la régulation génique suggèrent qu'il y a peut-être deux types d'éléments géniques sensibles aux contraintes de cisaillement (positif et négatif) et en plus, des régulations multiples en compagnie des autres facteurs transcriptionnels.

La réponse des CE sur l'expression génique aux contraintes de flux peut être classée en trois types: augmentation précoce transitoire, augmentation continue de l'expression des ARNm et régulation biphasique: Le Tableau III résume les différents niveau de régulation de la transcription (niveau d'ARNm) des molécules par la contrainte de cisaillement.

En conclusion, il est possible de dire que les contraintes mécaniques induisent de nombreux événement

TABLEAU III

Régulation de la transcription (niveau d'ARNm) des molécules par la contrainte de cisaillement (d'après Braddock et col. 1998 et Stoltz et col. 1999)

Gene	Cellules utilisées	Réponse de l'ARN	SSRE	Autres facteurs
ET-1	HUVEC/BAEC	biphasique	-	AP-1
VCAM-1	HUVEC	diminue (τ forte) augmente (τ faible)	-	AP-1, NF- κ B
ACE	RAEC	diminue	+	SSRE, AP-1, Egr-1
TF	BAEC	augmente	-	Sp-1
TF	HAEC/HUVEC	augmente	-	Egr-1
Tm	HUVEC	biphasique	-	AP-1
PDGF-A	BAEC	biphasique	+	Egr-1
PDGF-B	BAEC	biphasique	+	
ICAM-1	HUVEC	augmente (ou biphasique)	+	AP-1, NF- κ B
TGF- β	BAEC	augmente	+	AP-1, NF- κ B
c-fos, c-jun	HUVEC	augmente précocement transitoirement	+	AP-1
eNOS	HUVEC	augmente	+	AP-1, NF- κ B
MCP-1	HUVEC	biphasique	+	AP-1, NF- κ B

ACE: angiotensin-converting enzyme; TF: tissue factor; c-fos and c-jun: members of proto-oncogen family; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; AP-1: activator protein-1; NF- κ B: nuclear factor- κ B; Egr-1: early growth response factor-1; SSRE: shear stress response element.

clé dans la physiopathologie de l'endothélium vasculaire. Pour résumer ce phénomène, Papadaki et Eskin ont proposé, en 1997, un premier schéma résumant les voies de signalisation à "réponses multiples" activées par les contraintes de cisaillement au sein des CE (Fig. 7).

L'activation d'un ou plusieurs hypothétiques mécano-récepteurs induit des événements bio-chimiques qui conduisent à des changements intracellulaires au niveau de l'expression métabolique et génique de la cellule, régulant donc la fonctionnalité de l'endothélium.

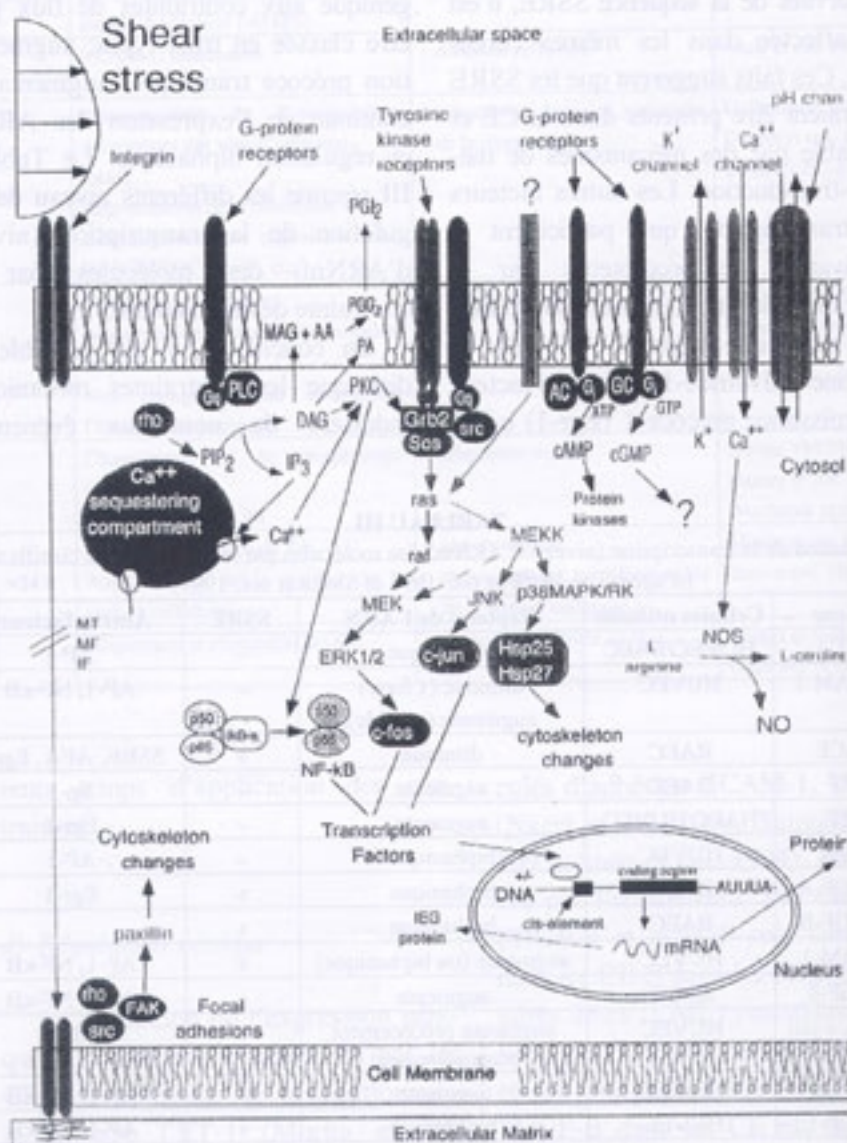


Fig. 7 - Représentation des différentes voies possibles de signalisation activées par les contraintes de cisaillement (d'après Papadaki et Eskin 1997).

Références

- Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Scrimachi N, Miyasaka M, Kamiya A. Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am J Physiol* 1994; 267: C679-C687.
- Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney Int* 1998; 54 (suppl.67): S100-S108.
- Barbee K, Mundel T, Lal R, Davies P. Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and non-aligned endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1995; 268: H1765-H1772.
- Berk B, Corson M, Peterson T, Tseng H. Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: A hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J Biomech* 1995; 28: 1439-1450.
- Berthiaume F, Frangos J. Flow-induced prostacyclin production is mediated by a pertussis toxin-sensitive G protein. *FEBS Lett* 1992; 308: 277-279.
- Bhargyalakshmi A, Berthiaume F, Reich K, Frangos J. Fluid shear stress stimulates membrane phospholipid metabolism in cultured human endothelial cells. *J Vasc Res* 1992; 29: 443-449.
- Braddock M, Schwachtgen J, Houston P, Dickson M, Lee M, Campbell C. Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells. *News Physiol Sci* 1998; 13: 241-46.
- Chen K-D, Li Y-S, Kim M, Li S, Chien S, Shyy J. Mechanotransduction in response to shear stress: roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem* 1999; 274: 18393-18400.
- Chiu J, Wang D, Chien S, Skalak R, Usami S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *J Biomech Eng* 1998; 120: 2-8.
- Cucina A, Sterpetti A, Pupelis G, Fragale A, Lepidi S, Cavallaro A, Giustiniani Q, D'Angelo L. Shear stress induces changes in the morphology and cytoskeleton organisation of arterial endothelial cells. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9: 86-92.
- Davies P. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 1995; 75: 519-560.
- Davies P, Remuzzi A, Gordon E, Dewey Jr. C, Gimbrone Jr. M. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2114-2117.
- Davies P, Tripathi S. Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circ Res* 1993; 2: 239-245.
- Davies P, Barbee K, Volin M, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wemick M, Jacobs E, Polacek D, DePaola N, Barakat A. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *J. Physiol.*, 1997-a, 59, 527-549.
- Davies P, Volin M, Joseph L, Barbee K. Endothelial response to hemodynamic shear stress: spatial and temporal considerations. In: Born G.V.R. and Schwartz C.J. Ed. New horizon series; Vol.3 Schattauer (Stuttgart) "Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities" 1997-b; pp 167-176.
- Dewey Jr C.F, Bussolari S, Gimbrone Jr M, Davies P. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 1981; 103: 177-185.
- Diamond S, Eskin S, McIntire L. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 1989; 243: 1483-1485.
- Diamond S, Sharefkin J, Dieffenbach C, Frasier-Scott K, McIntire L, Eskin S. Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J Cell Physiol* 1990; 143: 364-371.
- Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. *Vascular Endothelium, Physiology, pathology, and Therapeutic Opportunities*. in: Born G.V.R. and Schwartz C.J. Ed. New horizon series; Vol .3 Schattauer (Stuttgart), 1997; pp 25.
- Franke R, Gräfe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* 1984; 307: 648-649.

- Fry DL. Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity L gradients. *Circ Res* 1968; 22: 167-197.
- Galbraith C, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998; 40: 317-330.
- Gimbrone M Jr, Nagel T, Topper J. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997; 100, 11: S61-S65.
- Girard P, Nerem R. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J Cell Physiol* 1995; 163: 179-193.
- Gooch KJ, Tennant C. Mechanical forces: their effects on cells and tissues. *Landes Bioscience* 1997; pp 15-53.
- Gudi S, Craig B, Frangos JA. Fluid flow rapidly activates G-proteins in human endothelial cells. *Circ Res* 1996; 79: 834-839.
- Helmlinger G, Geiger RV, Schreck S, Nerem R. Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. *J Biomech Eng* 1991; 113: 123-131.
- Helmlinger G, Berk B, Nerem R. Calcium responses of endothelial cell monolayers subjected to pulsatile and steady laminar flow differ. *Am J Physiol* 1995; 269: C367-C375.
- Himmel HM, Whorton AR, Strauss HC. Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 1993; 21: 112-127.
- Hsieh H, Li N, Frangos J. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels. *Am J Physiol* 1991; 260: H642-H646.
- Hsieh H, Li N, Frangos J. Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by Protein kinase C. *J Cell Physiol* 1992; 150: 552-558.
- Hsieh H, Li N, Frangos J. Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1993; 154: 143-151.
- Kuchan M, Jo H, Frangos J. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol* 1994; 267: C753-C758.
- Kuchan M, Frangos J. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266: C628-C636.
- Li Y, Shyy J, Li S, Lee J, Su B, Karin M, Chien S. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Mol Cell Biol* 1996; 16, 11: 5947-5954.
- Mohan S, Mohan N, Sprague E. Differential activation of NF κ B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. *Am J Physiol* 1997; 273: C572-C578.
- Morita T, Kurihara H, Maemura K, Yoshizumi M, Nagai R, Yazaki Y. Role of Ca²⁺ and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 Gene expression. *Circ Res* 1994; 75: 630-636.
- Muller S, Sun R, Legrand S, Labrador V, Wang X, Stoltz JF. Influence of laminar shear stress on cytoskeleton and ICAM-1 expression of endothelial cells. *Appl Mech Eng* 1999; 4: 151-156.
- Nagel T, Resnick N, Atkinson W, Dewey Jr. C, Gimbrone Jr. M. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 885-891.
- Nerem R, Levesque M, Cornhill J. Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng* 1981; 103: 172-176.
- Nollert M, Diamond S, McIntire L. Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. *Biotech Bioeng* 1991; 38: 588-602.
- Ohno M, Gibbons G, Lopez F, Cooke J, Dzau V. Shear stress induces transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) expression via a flow-activated potassium channel. *Clin Res* 1992; 40, 294.
- Olesen S, Clapham D, Davies P. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 331: 168-170.
- Ookawa K, Sato M, Ohshima N. Morphological changes of endothelial cells after

- exposure to fluid-imposed shear stress: differential responses induced by extracellular matrices. *Biorheology*, 1993; 30: 131-140.
- Papadaki M, Eskin S. Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol Prog* 1997; 13: 209-221.
 - Patrick C, McIntire L. Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Blood Perf* 1995; 13: 112-124.
 - Prasad A, Logan S, Nerem R, Schwartz C, Sprague E. Flow-related responses of intracellular inositol phosphate levels in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1993; 72: 827-836.
 - Redmond E, Cahill P, Sitzmann J. Flow-induced regulation of G-protein expression in cocultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18, 1: 75-83.
 - Reinhart W. Shear-dependence of endothelial functions. *Experientia* 1994; 50, 2: 87-93.
 - Resnick N, Gimbrone M. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 1995; 9: 874-882.
 - Sampath R, Kukielka G, Smith C, Eskin S, McIntire L. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng* 1995; 23: 247-256.
 - Sato M, Levesque M, Nerem R. Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 276-286.
 - Sato M, Ohshima N. Flow-induced changes in shape and cytoskeletal structure of vascular endothelial cells. *Biorheology* 1994; 31: 143-153.
 - Shen J, Lusinskas FW, Connolly A, Dewey Jr CF, Gimbrone Jr MA. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1992; 262: C384-C392.
 - Shyy HJ, Hsien HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4678-4682.
 - Simon M, Strathmann M, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252, 5007: 802-808.
 - Stoltz JF, Wang X, Dumas D, Pagan E, Paulus F, Mainard D, Maurice G, Netter P, Muller S. Influence of mechanical forces on cells and tissues. *Biorheology* 2000; 37: 3-14.
 - Thoumine O, Zaegler T, Girard P, Nerem R. Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. *Exp Cell Res* 1995; 219: 427-441.
 - Truskey G, Barber K, Robey T, Olivier L, Combs M. Characterization of a sudden expansion flow chamber to study the response of endothelium to flow recirculation. *J Biomech Eng* 1995; 117: 203-210.
 - Tseng H, Peterson T, Kovach N, Berk B. Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res* 1995; 77: 869-878.
 - Walpole P, Gotlieb A, Langille B. Monocyte adhesion and changes in endothelial cell number, morphology, and F-actin distribution elicited by low shear stress in vivo. *Am J Pathol* 1993; 142: 1392-1400.
 - Wang N, Butler J, Ingber D. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Nature*, 1993; 260: 1124-1127.
 - Wary K, Mainiero F, Isakoff S, Marcantonio E, Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 1996; 87, 4: 733-743.
 - Wechezak A, Viggers R, Sauvage L. Fibronectin and F-actin redistribution in cultured endothelial cells exposed to shear stress. *Lab Invest* 1985; 53: 639-647.
 - Williams P, Warwick R, Dyson M, Bannister L, Werneck H. *Gray's Anatomy*, thirty-eighth edition, Churchill Livingstone, Great Britain 1995; pp 1451-1459; pp 36-43.
 - Xiao Z, Zhang Z, Diamond S. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium dependent but not calcium activated. *J Cell Physiol* 1997; 171: 205-211.