



Université de Montréal

**Caractérisation des processus moléculaires impliqués dans l'activation  
de la protéine IKK $\beta$  par l'angiotensine II et son rôle dans la réponse  
phénotypique des CMLV.**

Par  
Priscilla Doyon

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Sciences Pharmaceutiques  
option Pharmacologie

20 décembre 2013

© Priscilla Doyon, 2013

## Résumé

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) régule l'homéostasie de la contraction des artères. Or, suivant la liaison de l'angiotensine II (Ang II) à son récepteur AT1, le SRAA est également impliqué dans l'activation de voies de signalisation à l'origine de l'inflammation et de l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), soit deux processus participant au remodelage vasculaire caractéristique de diverses maladies cardiovasculaires, telles l'hypertension et l'athérosclérose. Ces pathologies sont les premières causes de mortalité naturelle en Amérique et les traitements les ciblant ne sont pas optimaux puisqu'ils visent seulement quelques facteurs de risque qui leur sont associés. Ainsi, la détermination des effecteurs intracellulaires régulant ces voies délétères est nécessaire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'inflammation Ang II-dépendante dans les CMLV est attribuée au facteur de transcription nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B). Cependant, les processus moléculaires couplant le récepteur AT1 à son activation sont peu caractérisés. L'étude abordant cette question démontre *in vitro* que NF- $\kappa$ B est activé par la protéine I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) dans les CMLV exposées à l'Ang II et que cette kinase est régulée par deux voies de signalisation indépendantes, mais complémentaires afin d'assurer son activation rigoureuse et soutenue. L'une des voies est précoce et dépend des seconds messagers ainsi que de deux nouveaux effecteurs sous-jacents au récepteur AT1, soit la E3 ligase TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) et la IKK kinase transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) tandis que la seconde est tardive et résulte de la signalisation mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2) - extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) - ribosomal S6 kinase (RSK). L'inhibition conjointe de ces voies abroge complètement la réponse inflammatoire, ce qui indique qu'elles en sont la seule source. Ainsi, l'inhibition d'IKK $\beta$  pourrait suffire à contrer l'inflammation impliquée dans le remodelage vasculaire associé à une suractivation du SRAA. Une découverte des plus novatrices découle de cette étude, qui veut que la E3 ligase TRAF6 est un nouvel effecteur des

récepteurs couplés aux protéines G et est à l'origine de la formation d'un nouveau type de second messager, soit des chaînes libres de poly-ubiquitines.

Les mécanismes moléculaires à la base de l'hypertrophie Ang II-dépendante dans les CMLV sont également peu définis. Or, suivant la parution d'un article démontrant qu'IKK $\beta$  dans les cellules cancéreuses participe aux mécanismes d'initiation de la traduction en réponse au facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) via la phosphorylation de la protéine Tuberous sclerosis 1 (TSC1) et donc l'activation du complexe mammalian target of rapamycin (mTORC1), une hypothèse a été émise selon laquelle cette kinase serait impliquée dans la synthèse protéique Ang II-dépendante dans les CMLV. Les expériences effectuées *in vitro* dans des CMLV exposées à l'Ang II démontrent qu'IKK $\beta$  induit la phosphorylation de TSC1 ainsi que l'activation de mTORC1 et de ses substrats S6 kinase 1 (S6K1) et translational regulators eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1), deux protéines impliquées directement dans l'hypertrophie. Par ailleurs, la synthèse protéique au niveau des CMLV exposées à l'Ang II est réduite de 75% suivant la diminution de l'expression d'IKK $\beta$  et suivant la surexpression d'un mutant de TSC1 dont le site consensus d'IKK $\beta$  a été modifié, faisant de cette kinase un médiateur majeur au niveau de ce processus.

Ainsi, *in vitro* IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II est en amont de deux processus impliqués dans un remodelage vasculaire à l'origine de maladies cardiovasculaires. De plus, plusieurs facteurs de risque de ces pathologies convergent à l'activation d'IKK $\beta$ , ce qui en fait une cible thérapeutique particulièrement attrayante. Qui plus est, l'administration d'un inhibiteur d'IKK $\beta$  à des rats diminue non seulement la synthèse protéique dépendante de l'Ang II au niveau de l'aorte et des artères mésentériques, mais également la synthèse de la protéine pro-inflammatoire VCAM-1 par les cellules composant l'aorte, ce qui confirme son envergure en tant que cible.

Mots-clés : Hypertension, Athérosclérose, Remodelage vasculaire, Inflammation, Hypertrophie, Angiotensine II, TRAF6, TAK1, IKK $\beta$ , NF- $\kappa$ B, TSC1, mTOR



## Abstract

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays an essential role in the homeostatic control of arterial pressure through its influence on the vascular smooth muscle cells (VSMC) contraction-relaxation cycle. Nevertheless, activation of the AT1 receptor by angiotensin II (Ang II) is also involved in VSMC inflammation and hypertrophy. The latter are two processes related to arterial remodeling which is the culprit of some cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis. These diseases are the leading cause of natural death in America and the treatments available to date are not optimum because they target only some and not all risk factors associated to it. Thus, determination of the intracellular effectors involved in these deleterious signaling pathways is needed to identify new therapeutic targets.

Ang II-induced inflammation in VSMC is under the control of the transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B). However, the molecular mechanisms coupling the AT1 receptor to its activation are not well characterized. The study addressing this issue demonstrates *in vitro* that the activation of NF- $\kappa$ B is dependent of the activation of I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) in VSMC. This kinase is regulated by two independent, but complementary signaling pathways to insure its vigorous and sustained activation. One of them is an early event that relies on second messengers and two novel effectors of the AT1 receptor, the E3 ligase TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) and the IKK kinase transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1). The other pathway is delayed and relies on the- mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2) - extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) - ribosomal S6 kinase (RSK) axis. Moreover, inhibition of both pathways completely abolishes the Ang II-induced inflammatory response in VSMC which indicates that they are the only one implicated. Thus, inhibition of IKK $\beta$  would be possibly sufficient to compromise the inflammation implicated in the development of vascular remodeling. One of the innovative discoveries that has emerged from this latest study is that the E3 ligase TRAF6 is a G protein-coupled receptors effector responsible for the formation of a new type of second messengers described as free poly-ubiquitin chains.

Regarding the Ang II-induced hypertrophic response, the molecular mediators involved in protein synthesis are also poorly defined. However, it has been shown that IKK $\beta$  has the ability to control the initiation of translation in response to tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) by its capacity to phosphorylate the protein Tuberous sclerosis 1 (TSC1) and then to activate the mammalian target of rapamycin complex (mTORC1) in cancer cells. Therefore, some *in vitro* experiments have been conducted in VSMC to determine whether IKK $\beta$  also contributes to this phenomenon in response to Ang II. Indeed, in VSMC exposed to Ang II, IKK $\beta$  has the ability to induce the phosphorylation of TSC1 and the activation of mTORC1 as well as its downstream effectors S6 kinase 1 (S6K1) and translational regulators eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (4E-BP1), proteins related directly to hypertrophy. Furthermore, Ang II-induced protein synthesis in VSMC is drastically reduced following a decrease in the expression of IKK $\beta$  and following the overexpression of a mutant of TSC1 in which the consensus site of IKK $\beta$  has been modified.

Thus, IKK $\beta$  acts upstream of two processes involved in the development of cardiovascular diseases related to vascular remodeling in response to Ang II *in vitro*. In addition, most of their risk factors converge to the activation of IKK $\beta$  making it an attractive therapeutic target. Moreover, this kinase is a protein of interest for the translational research, since the administration of an IKK $\beta$  inhibitor to rats reduces not only the Ang II-induced protein synthesis in the aorta and mesenteric arteries, but also the synthesis of the pro-inflammatory protein VCAM -1.

Key words : Hypertension, Atherosclerosis, Vascular remodeling, Inflammation , Hypertrophy, Angiotensin II, TRAF6, TAK1, IKK $\beta$ , NF- $\kappa$ B , TSC1, mTOR

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Listes des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements .....	xvi
1.0 Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA).....	1
1.1 L'avènement .....	4
1.2 La rénine .....	4
1.2.1 La régulation de la libération de rénine .....	5
1.2.2 La rénine et son précurseur.....	6
1.2.3 Le récepteur de la rénine et de la prorénine.....	7
1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine .....	8
1.3.1 ACE.....	8
1.3.2 ACE2.....	10
1.4 Les peptides de la famille angiotensine et leurs récepteurs couplés aux protéines G .....	11
1.4.1 L'Ang II et les récepteurs AT1 et AT2.....	11
1.4.1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	12
1.4.1.2 L'Ang II et le récepteur AT1 .....	14
1.4.1.2.1 Description sommaire de la désensibilisation et de l'internalisation du récepteur AT1 .....	15
1.4.1.2.2 Réponses cellulaires associées à l'activation du récepteur AT1 par l'Ang II .....	16
1.4.1.3 L'Ang II et le récepteur AT2 .....	17

1.4.2 Les dérivés bioactifs de l'Ang II : Ang III, Ang IV, Ang V et Ang (1-7) .....	18
1.4.2.1 Le dérivé Ang III.....	19
1.4.2.2 Les dérivés Ang IV et Ang V .....	19
1.4.2.3 Le dérivé Ang (1-7).....	20
1.5 L'aldostérone .....	21
2.0 Le SRAA revisité .....	22
2.1 Le SRAA cellulaire : Un système autocrine/paracrine et intracrine.....	23
2.2 Le SRAA tissulaire .....	24
2.2.1 Le rein .....	25
2.2.2 Le cœur.....	26
2.2.3 Le système vasculaire.....	28
2.2.3.1 Les vaisseaux sanguins.....	28
2.2.3.2 Le SRAA intravasculaire .....	31
2.2.3.2.1 Fonctions : Accent sur les cellules endothéliales et les CMLV .....	32
2.2.3.3 Remodelage vasculaire .....	33
2.2.3.3.1 L'hypertension.....	35
2.2.3.3.2 L'athérosclérose.....	38
3.0 Les modifications post-traductionnelles.....	44
3.1 La phosphorylation et l'ubiquitination .....	45
3.1.1 La phosphorylation .....	45
3.1.1.1 Le kinome .....	45
3.1.1.2 Domaine catalytique .....	50
3.1.1.3 Spécificité du substrat.....	50
3.1.1.4 Phosphatases .....	51
3.1.2 L'ubiquitination .....	52

3.1.2.1 L'ubiquitine.....	54
3.1.2.2 L'enzyme d'activation : E1 .....	54
3.1.2.3 L'enzyme de conjugaison : E2 .....	55
3.1.2.4 L'ubiquitine ligase: E3 .....	55
3.1.2.5 Fonctions de l'ubiquitination.....	56
3.1.2.6 Domaine de liaison à l'ubiquitine .....	59
3.1.2.7 Les désubiquitinases .....	60
3.1.2.8 Chaînes libres de poly-Ub.....	60
3.1.2.9 L'ubiquitination : cible thérapeutique.....	61
4.0 Le complexe IKK .....	62
4.1 Découverte du complexe IKK : NF- $\kappa$ B .....	64
4.1.2 Voies canoniques d'activation de NF- $\kappa$ B .....	65
4.1.3 Voies non canoniques d'activation de NF- $\kappa$ B .....	67
4.1.4 NF- $\kappa$ B : Un point de convergence .....	67
4.2 Régulation de l'activité du complexe IKK.....	69
4.2.1 TAK1 .....	69
4.2.2 MEKK3.....	70
4.2.3 Phosphatases.....	71
4.2.4 TRAFs .....	72
4.2.5 DUBs.....	73
4.2.6 IKK $\beta$ : Un point de convergence.....	74
4.2.6.1 TNF $\alpha$ .....	75
4.2.6.1.1 Pathologie associée au TNF $\alpha$ : Accent sur l'athérosclérose .....	78
4.2.4.2 IL-1 $\beta$ .....	79
4.2.4.2.1 Pathologie associée à l'IL-1 $\beta$ : Accent sur l'athérosclérose.....	83

4.2.4.3 LPA.....	84
4.2.4.3.1 Pathologie associée au LPA : Accent sur l'athérosclérose.....	86
4.3 Substrats d'IKK $\beta$ .....	88
4.3.1 mTOR.....	88
4.3.1.2 TSC1/TSC2 .....	89
4.3.1.3 4EBP1 et S6K.....	89
4.3.1.4 Pathologie associée à mTOR : Accent sur l'athérosclérose .....	91
Chapitre 2 : Hypothèses et Objectifs .....	93
1.0 Hypothèses.....	93
2.0 Objectifs.....	95
2.1 Objectif 1.....	95
2.1.1 Rationnelle et sommaire des résultats .....	95
2.2 Objectif 2.....	97
2.2.1 Rationnelle et sommaire des résultats .....	97
Chapitre 3 : Résultats .....	99
1.0 The Journal of Biological Chemistry .....	99
2.0 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology .....	135
Chapitre 4 : Discussions et Perspectives .....	174
1.0 The Journal of Biological Chemistry .....	174
1.1 Voie d'activation précoce d'IKK $\beta$ dépendante de l'Ang II.....	178
1.1.1 Implications thérapeutiques de la voie précoce : Accent sur l'athérosclérose .....	181
1.2 Voie d'activation tardive d'IKK $\beta$ dépendante de l'Ang II.....	183
1.2.1 Implications thérapeutique de la voie tardive : Accent sur l'athérosclérose .....	186

1.3 Plurithérapie.....	187
1.4 Perspectives et résultats préliminaires les appuyant .....	188
1.4.1 Figures résultats préliminaires.....	193
2.0 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.....	203
2.1 Étude <i>in vitro</i> .....	205
2.2 Étude <i>in vivo</i> .....	209
2.3 Implications thérapeutiques : Accent sur l'athérosclérose .....	211
2.4 Perspectives et résultats préliminaires les appuyant .....	213
2.4.1 Figures résultats préliminaires.....	217
Chapitre 5 : Conclusion .....	222
Références .....	224
Annexe 1 .....	i
1.0 Article premier auteur supplémentaire .....	ii
1.1 PLoS Pathogens.....	ii

## Listes des figures

<b>Figure. 1</b> : Le SRAA classique.....	2
<b>Figure. 2</b> : Le SRAA à ce jour.....	3
<b>Figure. 3</b> : Le cycle d'activation/inactivation des protéines G. ....	13
<b>Figure. 4</b> : Structure d'une artère.....	30
<b>Figure. 5</b> : Classification du remodelage vasculaire .....	34
<b>Figure. 6</b> : Développement de l'athérosclérose. ....	40
<b>Figure. 7</b> : Le kinome.....	47
<b>Figure. 8</b> : Domaine catalytique des kinases. ....	51
<b>Figure. 9</b> : Mécanisme de l'ubiquitination. ....	53
<b>Figure. 10</b> : Les différents types d'ubiquitination. ....	57
<b>Figure. 11</b> : Système ubiquitine-protéasome.....	58
<b>Figure. 12</b> : Le complexe IKK. ....	63
<b>Figure. 13</b> : Voie canonique d'activation de NF- $\kappa$ B.....	66
<b>Figure. 14</b> : Voie non canonique d'activation de NF- $\kappa$ B.....	68
<b>Figure. 15</b> : Les protéines TRAFs.....	73
<b>Figure. 16</b> : Voie d'activation d'IKK $\beta$ dépendante du TNF $\alpha$ .....	76
<b>Figure. 17</b> : Voie d'activation d'IKK $\beta$ dépendante de l'IL-1 $\beta$ .....	80
<b>Figure. 18</b> : Complexification de la voie d'activation d'IKK $\beta$ dépendante de l'IL-1 $\beta$ .....	82
<b>Figure. 19</b> : Voie d'activation d'IKK $\beta$ dépendante du LPA. ....	85
<b>Figure. 20</b> : Voie d'activation d'IKK $\beta$ dépendante du TCR.....	87
<b>Figure. 21</b> : Régulation de l'activité de mTORC1. ....	90
<b>Figure. 22</b> : TRAF6 est impliquée dans la signalisation induite par le LPA.....	193
<b>Figure. 23</b> : TRAF6 est impliquée dans la signalisation induite par la thrombine. ..	194
<b>Figure. 24</b> : Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à l'Ang II: IKK $\gamma$ .....	195
<b>Figure. 25</b> : Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à l'Ang II: TAB2. ....	196



**Figure. 26:** Isolation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à l'Ang II. .... 197

**Figure. 27 :** Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées au LPA: IKK $\gamma$ . .... 198

**Figure. 28 :** Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à la thrombine: IKK $\gamma$ . .... 199

**Figure. 29 :** TRAF6 induit la formation de chaînes de poly-Ub en Lys63 en réponse à la thrombine: IKK $\gamma$ . .... 200

**Figure. 30 :** TRAF6 est impliquée dans la signalisation induite par l'Ang II. .... 201

**Figure. 31 :** TRAF6 est impliquées dans les réponses physiologiques des CMLV exposées à l'Ang II. .... 202

**Figure. 32 :** Le traitement au tamoxifène des CMLV isolées de l'aorte des souris *SMA-CreER<sup>T2</sup>IKK $\beta$ <sup>Flox/Flox</sup>ApoE<sup>-/-</sup>* réduit l'expression d'IKK $\beta$  ainsi que la signalisation IKK $\beta$ -dépendante. .... 217

**Figure. 33:** La délétion d'IKK $\beta$  dans les CML des souris diminue les lésions athérosclérotiques induites par l'Ang II au niveau de l'aorte..... 218

**Figure. 34:** La délétion d'IKK $\beta$  dans les CML des souris atténue les anévrismes de l'aorte abdominale sus-rénale induits par l'Ang II. .... 221

## Liste des abréviations

<b>3D</b>	Tridimensionnelle
<b>4E-BP1</b>	Translational regulators eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein
<b>ACE</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>ACE2</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine II
<b>AJG</b>	Appareil juxtaglomérulaire
<b>AKT</b>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>Ang I</b>	Angiotensine I
<b>Ang II</b>	Angiotensine II
<b>AoG</b>	Angiotensinogène
<b>ARB</b>	Antagonistes du récepteur AT1
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AVC</b>	Accidents vasculaires cérébraux
<b>BCL10</b>	B-Cell CLL/Lymphoma 10
<b>CARMA</b>	Caspase recruitment domain family
<b>ciAP</b>	Cellular inhibitor of apoptosis
<b>CML</b>	Cellules du muscle lisse
<b>CMLV</b>	Cellules musculaires lisses vasculaires
<b>CYLD</b>	Tumor suppressor cylindromatosis protein
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DUB</b>	Désubiquitinase
<b>E1</b>	Enzyme activatrice de l'ubiquitine
<b>E2</b>	Enzyme de conjugaison
<b>E3</b>	Enzyme ubiquitine ligase
<b>eIF4E</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4E
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>FADD</b>	FAS-associated death domain (FADD)
<b>Fak</b>	Focal adhesion kinase
<b>GAP</b>	GTPase-activating protein

<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GRK</b>	G protein-coupled receptor kinases
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HECT</b>	Homologous to the E6-AP carboxy terminus
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B kinase
<b>IL-1RAcP</b>	IL-1 receptor accessory protein
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukine-1 $\beta$
<b>IRAK</b>	IL-1 receptor-associated kinase
<b>IRAP</b>	Protéine insuline-régulée aminopeptidase
<b>JAK</b>	Janus family kinase
<b>JNK</b>	Jun N-terminal kinase
<b>LDL</b>	Lipoprotéine
<b>LPA</b>	Acide lysophosphatidique
<b>LUBAC</b>	Linear ubiquitin chain assembly complex
<b>M6P-R</b>	Insulin-like growth factor
<b>MALT1</b>	Mucosa-associated lymphoid tissue
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein 1
<b>MEK</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
<b>MEKK3</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
<b>ML120B</b>	N-(6-chloro-7-methoxy-9H- $\beta$ -carbolin-8-yl)-2-methylnicotinamide
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>Mnk1</b>	Mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase-1
<b>MR</b>	Récepteur de type minéralocorticoïde
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>mTORC</b>	Mammalian target of rapamycin complex
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene (88)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NIK</b>	NF- $\kappa$ B-inducing kinase
<b>NO</b>	Oxyde nitrite
<b>Oxy-LDL</b>	Lipoprotéine oxydée

<b>p38</b>	p38 mitogen-activated protein kinase
<b>PDK1</b>	(PI3K)/3-phosphoinositide-dependent kinase 1
<b>PKA</b>	Protéines AMPc dépendantes
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PRR</b>	(pro)renin receptor
<b>PYK2</b>	Proline-rich tyrosine kinase 2
<b>RCPG</b>	Récepteurs couplés aux protéines G
<b>Rheb</b>	Ras homolog enriched in brain
<b>RING</b>	Really interesting new gene
<b>RIP1</b>	Receptor-interacting protein-1 (RIP1)
<b>ROS</b>	Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>RSK</b>	Ribosomal S6 kinase
<b>S6K1</b>	S6 kinase 1
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA
<b>siARN</b>	ARN interférent
<b>SLN</b>	Signal de localisation nucléaire
<b>SRAA</b>	Système rénine-angiotensine-aldostérone
<b>SRC</b>	v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
<b>TAK1</b>	Transforming growth factor-beta-activated kinase 1
<b>TCR</b>	Récepteurs des cellules T
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor β
<b>TNF</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>TNFR</b>	Récepteur du facteur de nécrose tumorale
<b>TRADD</b>	TNFR1-associated death domain
<b>TRAF</b>	TNF receptor-associated factor
<b>TSC</b>	Tuberous sclerosis
<b>Ub</b>	Ubiquitine
<b>UBD</b>	Domaine de liaison à l'ubiquitine
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion protein 1

*À moi en toute humilité...*

## Remerciements

Des mercis, je pourrais en citer des millions pour ma plus grande idole, soit ma mère. Mais surtout maman, merci pour ta continuelle présence, tes précieux conseils, ta confiance, ta fierté, ton dévouement, ta force, ta sagesse et tout ton amour. Le seul endroit où je me sens en parfaite sécurité, c'est dans tes bras, tu es ma source de réconfort, de motivation et de paix. Merci de m'avoir offert une enfance merveilleuse, une adolescence incroyable et de m'avoir guidée tout le long du parcours à la vie adulte me permettant ainsi de devenir une femme épanouie et heureuse. La plus belle chose que tu m'aies dite est qu'une mère est une maman pour l'éternité, je sais ainsi que tu seras toujours là pour moi ta grande fille. Tu es mon guide, mon ange gardien et mon modèle. Je n'espère qu'une seule chose, être une maman aussi extraordinaire que toi auprès de mes enfants! Je t'aime....

Merci à un grand homme, soit mon père. Papa tu es ma référence dans la vie. En effet, tu es un homme respecté par ses pairs pour ton altruisme ainsi que ton leadership. Tu ne t'es jamais laissé abattre, au contraire tu as toujours affronté les défis avec une férocité hors du commun. Qui plus est, tu as mis certains rêves de côté afin de consacrer corps et âme à ta famille. Bref, comme le dit si bien l'adage : le plus fort, c'est mon père. Je me suis souvent fait dire qu'à ma naissance j'étais ta plus grande fierté, cependant aujourd'hui je n'ai plus besoin de personne pour ressentir cette dernière. Je sais que tu irais décrocher la lune pour mon bonheur. Ton aide et tes encouragements sont à la base de toutes mes réussites. Tu es mon héros. Je t'aime...

Merci à mon petit frère Michaël pour son positivisme, sa joie de vivre et son soutien. Bravo pour tous tes accomplissements mon frère autant au niveau de ton travail que de ta santé! Merci à ma petite sœur Audrey pour son respect et sa complicité. Soit forte dans l'adversité ma sœur et tu atteindras tes rêves j'en suis confiante. Merci à mon petit petit frère Jérémy pour son amour inconditionnel ainsi que sa gentillesse et sa générosité sans borne. Reste comme tu es mon frère tu es une personne unique! Bref, ma sœur et mes frères vous êtes ce que j'ai de plus

précieux dans la vie, je suis fière de vous, je veille sur vous, je serai toujours là pour vous. Ma porte est toujours ouverte! Je vous aime...

Merci à mon âme sœur Guillaume. Mon amoureux nous avons déjà fait un bon bout de chemin ensemble dans le respect, la joie, la sincérité et la sérénité. Je souhaite continuer ainsi pour l'éternité, car tu es mon autre moitié. Nous avons tant de projets et de rêves, l'avenir nous appartient! Merci pour tous les regards remplis d'affection et de fierté que tu me lances tous les jours, merci pour ta compréhension, merci de m'accueillir dans tes bras tant dans les moments les plus merveilleux que les plus difficiles. C'est au moment où j'ouvre les yeux le matin et que je vois ton magnifique sourire que je sais et je sens que je suis amoureuse et que je le serai à jamais. Merci, pour nos futurs petits bouts de choux, tu seras non seulement l'amour de ma vie, mais également le meilleur père de la terre. Bref, je t'aime plus qu'hier, mais beaucoup moins que demain. J'aimerais également remercier mes beaux parents, Hélène et Gilles, qui même de l'autre côté de l'atlantique croient en moi et me transmettent leurs ondes positives. Merci à vous deux d'être aussi présents dans nos vies! Vous êtes la preuve que la citation : loin des yeux, loin du cœur ne s'applique pas à tous. Bien au contraire, être en mesure de ressentir tout l'amour, le bonheur et la joie que vous éprouver pour moi et Guillaume au son de vos voix est unique et nous soudent profondément en tant que famille. Je suis heureuse de faire partie de votre vie et d'être comme vous le dites si gentiment votre belle fille préférée.

Merci à mes collègues et amis Simon-Pierre et Myriam. Simon, merci de m'avoir transmis tes connaissances scientifiques, merci pour tes imitations, tes blagues, le super bon vin, les restos, l'écoute, les encouragements, la flûte, la guitare, et même le violon, mais surtout merci pour les innombrables fous rires. Ma belle Myriam, je suis si fière de toi! Bravo pour tes réussites et ta belle petite famille. Merci de ton écoute, de ton temps, de tes conseils, de ta générosité, de ton attention et mille autres mercis pour tout ce que tu as fait pour moi. Bref, tu es un ange qui a été mis sur ma route et je ne l'oublierai jamais.

Merci à Isabelle, soit mon amie pour la vie. Isa nous nous sommes connus autour de bons nachos et avons fait équipe en labo tout au long de nos études. Mais, Dieu seul sait combien je suis heureuse qu'une si forte amitié se soit développée

entre nous. En effet, tu as toujours été là pour moi! Je ne sais pas comment j'aurais pu traverser les moments les plus difficiles sans tes précieux conseils, tes précieuses vérités, ton dévouement et surtout le don de ton temps, et ce, en tout temps. Nous avons gravi les échelons ensemble, avons vécu des hauts et des bas dans nos vies respectives qui ont consolidé notre amitié. De plus, je suis si fière de la merveilleuse femme que tu es aujourd'hui, tu as toujours travaillé fort pour atteindre tes objectifs et tu en as atteint plusieurs. Félicitations! Tu es tellement une bonne personne que tu mérites tout ce dont tu aspires. Vivement nos futures activités, soupers et qui sait voyages! Je t'aime mon amie...

J'aimerais également remercier mes présents et anciens collègues : Annie Bibeau-Poirier, Jean-François Clément, Annie Douillette, Valérie Chénard, Tasheen Wissanji, Monique Arts, Florence Dô, Wendy van Zuijlen, Kashif Aziz-Khan et Alexandre Marrineau pour votre aide au *bench* et votre soutien moral au quotidien.

Je remercie mon mentor et directeur de recherche Marc Servant. Merci de m'avoir permis de travailler au sein de ta super équipe, merci pour ta passion, ton professionnalisme, ton écoute, tes innombrables encouragements et toutes les récompenses que tu as offert à l'équipe, tels tes super bons soupers et les nombreux congrès. Mais, un merci tout spécial pour ta confiance, tu as toujours cru en mes capacités. Ceci m'a permis de persévérer, de m'épanouir et finalement d'acquérir moi-même une confiance en mes moyens.

Finalement, un petit clin d'œil au Dr. Marc Vigneault et au Dr. Richard L. Robert puisque sans eux cette thèse ne serait pas.



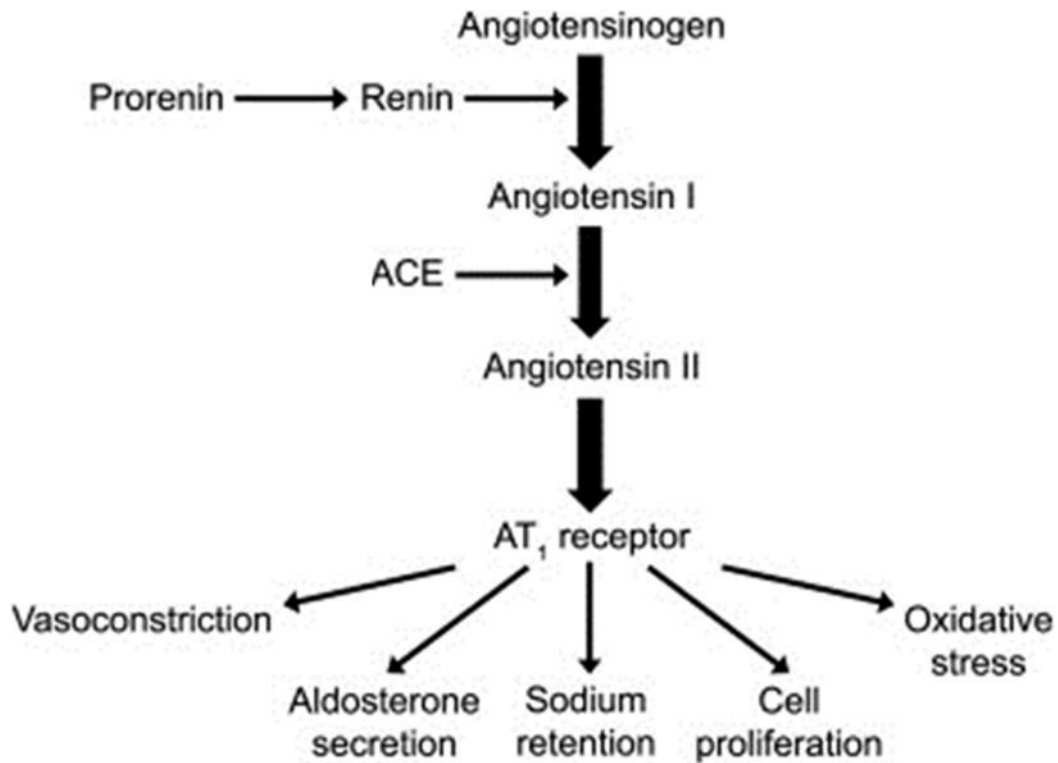
# Chapitre 1 : Introduction

## 1.0 Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)

Le SRAA est un système hormonal connu en premier lieu pour sa capacité à réguler la pression artérielle ainsi que l'homéostasie du volume des fluides et de la composition en sodium et potassium de ces derniers. [1] Par contre, depuis plusieurs années il est démontré que ce système est impliqué non seulement dans d'autres réponses physiologiques, tels le développement corporel, l'apprentissage et la mémorisation, mais également dans des réponses pathologiques, telles l'inflammation, l'hypertrophie et la fibrose, qui sont à l'origine de diverses maladies, comme l'obésité, le diabète, l'hypertension et l'athérosclérose. [2] Ainsi, puisque de nombreux effets physiologiques et pathologiques sont dépendants du SRAA, il est un sujet non négligeable dans l'univers de la recherche.

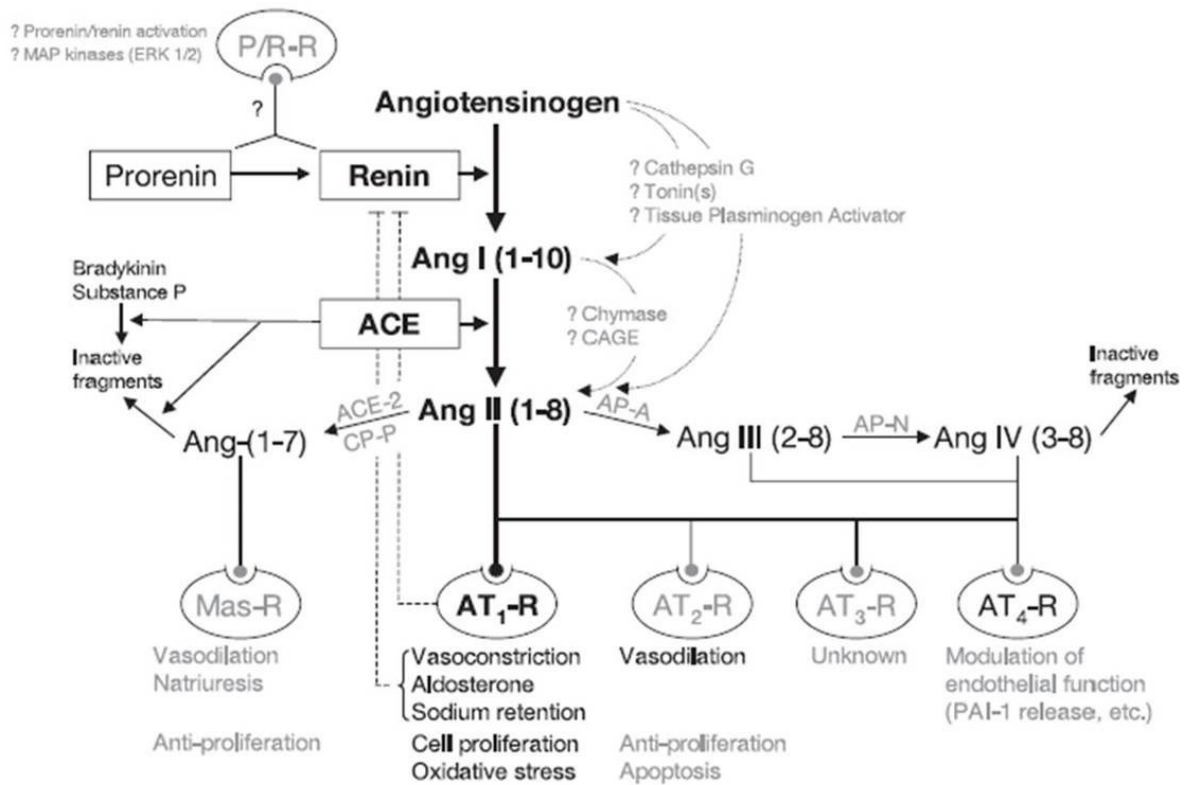
Le SRAA fut d'abord décrit en tant que système endocrine soit, un système au niveau de la circulation sanguine. [3] Ce système classique débute par le clivage de la prorénine en rénine dans les cellules juxtaglomérulaires du rein. La rénine est ensuite excrétée dans la circulation sanguine et transforme l'angiotensinogène (AoG) provenant du foie en un décapeptide inactif, soit l'angiotensine I (Ang I). Ce dernier est clivé en un octapeptide physiologiquement actif, soit l'angiotensine II (Ang II), par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans les poumons. Finalement, l'Ang II se lie à l'un ou l'autre de ses récepteurs couplés aux protéines G, soit AT1 ou AT2, afin d'induire ses effets. [1] (Figure. 1)

Cependant, plusieurs années de recherche illustrent une complexité plus élevée de ce système, telles la présence d'enzymes non conventionnelles menant à la production d'Ang II, la production d'autres métabolites actifs lors de la cascade qui s'associent à leur récepteur respectif ainsi que la présence de systèmes rénine-angiotensine locaux. (Figure. 2)



**Figure. 1 : Le SRAA classique.**

L'angiotensinogène, sous l'effet de la rénine est clivé en un décapeptide, soit l'angiotensine I qui est clivée par ACE en un octapeptide, soit l'angiotensine II qui en se liant à son récepteur de type AT1 induit ses effets. ACE: enzyme de conversion de l'angiotensine. *Gradman AH, Papademetriou V (2009) Am Heart J 157: S17-23.*



**Figure. 2 : Le SRAA à ce jour.**

L'angiotensinogène peut être clivé en Ang I ou directement en Ang II par d'autres enzymes que la rénine, dont la cathepsine G, la tonine et l'activateur tissulaire du plasminogène. Également, en addition à ACE, les protéases, telles la chymase, la cathepsine B et la trypsine ont la capacité de cliver l'Ang I en Ang II. Qui plus est, l'Ang II peut lier d'autres récepteurs que le récepteur AT1 et est le précurseur de plusieurs autres fragments bioactifs, soit l'Ang III (2-8), l'Ang IV (3-8), l'Ang V (3-7) et l'Ang (1-7) qui se lient à leur récepteur respectif. P/R-R : récepteur de la (pro)rénine; Ang : angiotensine; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine; AP-A : aminopeptidase A; AP-N: aminopeptidase N; AT-R : sous-type de récepteur à l'angiotensine; CAGE : chymostatin-sensitive angiotensin II-generating enzyme; CP-P : carboxypeptidase P; MAP : mitogen-activated protein; Mas-R : Mas receptor; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor 1. Steven A (2007) *J Manag Care Pharm* 13 (8) (suppl S-b): S9-S20

## 1.1 L'avènement

Un lien entre le rein et l'hypertrophie ventriculaire fut établi en 1836 par Richard Bright. Les travaux de Tigerstedt et Bergman ont permis de déterminer, en 1898, que cette corrélation était liée à une augmentation de la pression artérielle et que le principal effecteur en était la rénine. [4] En revanche, dans les années 1940, Kohlstaedt *et al.*, ont démontré que la rénine n'était pas la substance vasoconstrictrice en tant que telle, mais que la substance à l'origine de la vasoconstriction était produite lors de l'incubation de la rénine avec des protéines sanguines provenant du foie. Étant encore inconnue, cette protéine sanguine fut nommée rénine-activateur. Au cours des investigations portant sur la découverte de cette substance, deux équipes indépendantes réussirent à isoler et à identifier la protéine causant directement un effet presseur. Une équipe la nomma angiotonin et l'autre hypertensine, mais elle est aujourd'hui connue sous le nom d'Ang II. Diverses expériences furent effectuées afin de comprendre comment l'Ang II était formée à partir de la rénine et de la protéine sanguine dite rénine-activateur. Plusieurs laboratoires ont démontré que l'interaction entre la rénine et la rénine-activateur était enzymatique, ainsi ils en ont conclu que l'activateur était en fait le substrat. La rénine-activateur fut rebaptisée l'hypertensinogène, connue de nos jours sous le nom d'AoG. [5]

De ces découvertes émanèrent d'innombrables recherches ayant toutes pour but de démystifier les compréhensions moléculaires entourant le SRAA. Pourtant, malgré l'avancement de la science depuis la découverte de la rénine au 19<sup>e</sup> siècle, le SRAA est encore aujourd'hui d'actualité.

## 1.2 La rénine

La rénine est une enzyme de la famille des aspartyl protéases. Elle est synthétisée au niveau du rein et est libérée par la suite dans la circulation sanguine. Elle induit la première étape de la cascade enzymatique du SRAA qui consiste en l'hydrolyse du lien Leu10-Val11 de l'AoG afin de former le décapeptide inactif Ang I. [6] Ce phénomène est la réaction enzymatique causant le plus grand changement dans la vitesse du déroulement de la cascade, suite à une perturbation de l'équilibre.

Ainsi, la conversion de l'AoG en Ang I est définie comme étant l'étape limitante du SRAA. Plusieurs chercheurs clament donc que la rénine est la cible à préconiser afin de contrer les effets néfastes causés par le SRAA, puisqu'elle induit la première réaction de la cascade, qu'elle n'a que l'AoG en tant que substrat et que la formation de l'Ang I par cette dernière est l'étape limitante de la cascade. [7]

### **1.2.1 La régulation de la libération de rénine**

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein, et ce dernier, en comporte environ 1 300 000. L'appareil juxtaglomérulaire (AJG) est une composante du néphron et est constitué de trois éléments essentiels à la régulation de la libération de rénine. L'un de ces constituants est formé des cellules JG. Ces dernières synthétisent et libèrent la rénine dans la circulation sanguine. [8]

Le relargage de rénine par les cellules JG est en partie régulé par le système nerveux sympathique. En effet, une forte densité de nerfs sympathiques englobe les cellules JG. Ces derniers libèrent la noradrénaline en réponse à divers stimuli, telle une baisse de la pression artérielle. En se liant à son récepteur  $\beta$ 1-adrénergique au niveau des cellules JG, ce neurotransmetteur induit la libération de rénine. [9] La noradrénaline est également sécrétée sans l'apport d'un stimulus afin d'induire une libération basale de rénine. Cette sécrétion basale est essentielle au maintien de l'activation du SRAA en condition physiologique. [10]

Un autre élément de l'AJG est la macula densa qui est constituée d'un groupe de 15 à 20 cellules. Ces dernières détectent la concentration en sodium des fluides rénaux via un mécanisme de transport du chlorure de sodium. Une diminution du transport sodique active diverses cascades de signalisation qui résultent en un relargage de prostaglandines. Ces protéines induisent la libération de rénine en se liant à leurs récepteurs au niveau des cellules JG. [11]

Finalement, l'AJG contient le mésangium qui est composé de cellules mésangiales, soit des fibroblastes spécialisés ayant des propriétés contractiles. Elles influencent la pression sanguine au niveau de l'artériole afférente du rein en se contractant ou se dilatant. [12] En réponse aux changements de pression au sein de cette artériole, les cellules JG agissent tels des barorécepteurs afin de réguler la

libération de rénine. En effet, une diminution de la pression induit un amincissement de leur longueur ce qui active la sécrétion de rénine dans la circulation tandis qu'une augmentation de la pression induit leur extension ce qui inhibe le relargage de rénine. [13]

Une rétroaction négative s'effectue lors de la régulation de la libération de rénine. En effet, la rénine est une enzyme clé à l'origine de la formation de l'Ang II et cette hormone en se liant à son récepteur de type AT1 au niveau des cellules JG inhibe le relargage de cette dernière. Il y a donc un phénomène d'homéostasie intrinsèque au niveau du SRAA. [7]

### **1.2.2 La rénine et son précurseur**

Le précurseur de la rénine, soit la prorénine, contient un segment de 43 acides aminés qui obstrue l'accès de l'AoG au site actif de l'enzyme. [14] L'activation irréversible de la prorénine dépend donc du clivage de ce segment par diverses enzymes telles que la kallikréine, la convertase, la trypsine et la cathepsine-B dans les cellules JG, ce qui conduit à la formation de la rénine qui est caractérisée par l'accessibilité de son site enzymatique. [15-17] Au-delà du SRAA systémique, un tel système subsiste au niveau des cellules et tissus composant divers organes comme le cerveau, le cœur, le tissu adipeux, le foie et les vaisseaux sanguins. La production locale de l'AoG, d'ACE, de l'Ang I et de l'Ang II est irréfutable dans la littérature. [18] Par contre, une controverse existe toujours concernant la production locale de rénine, soit une production extra-rénale, et ce malgré certaines études, telles les publications de Silver R.B. *et al.*, en 2004 et 2008 démontrant la production locale de rénine au niveau cardiaque et pulmonaire dans les cellules de type mastocyte. [19,20] Ainsi qu'une étude publiée par Shorning B.Y. *et al.*, en 2012 démontrant une production locale de rénine au niveau intestinal. [21] Plusieurs chercheurs concluent en revanche que cette production locale de rénine s'effectue seulement lors d'un désordre pathologique et figurent ainsi que la rénine est bel et bien produite uniquement au niveau du rein en condition physiologique. [22] Par contre, bien qu'il soit l'unique substrat de la rénine, l'AoG peut également être clivé directement en Ang II par la cathepsine G, la tonine et l'activateur tissulaire du plasminogène. Ces

voies sont dites rénine-indépendantes et peuvent contrebalancer l'absence locale de rénine. [23]

Contrairement à la rénine, la prorénine est produite à forts taux dans certains tissus extra-rénaux tels que les glandes surrénales, les glandes submandibulaires, les ovaires, les testicules, la rétine et le cerveau. [2,3] La concentration de rénine plasmatique totale est définie par la conjonction des concentrations de la prorénine et de la rénine. La prorénine constitue de 75 à 90% de la concentration de rénine plasmatique totale ce qui est grandement plus élevée que la forme active. [24] Cet excès de prorénine plasmatique a intrigué de nombreux chercheurs. Une hypothèse selon laquelle la prorénine aurait un rôle fonctionnel a été émise suite à la démonstration de l'existence de récepteurs de la rénine qui ont la capacité de séquestrer et d'internaliser l'enzyme. Ainsi, de la même manière, les tissus n'exprimant pas la rénine pourraient séquestrer et activer la prorénine circulante, soit celle relarguée dans le sang suite à sa formation dans les cellules JG, ainsi que la prorénine locale, soit celle relarguée dans les régions interstitielles, suite à sa formation dans les tissus extra-rénaux. [2,25]

### **1.2.3 Le récepteur de la rénine et de la prorénine**

Le récepteur nommé insulin-like growth factor (M6P-R) a la capacité de lier et d'internaliser la rénine et la prorénine. Suite à son internalisation, la prorénine est transformée en rénine, qui est rapidement dégradée. La production de rénine n'occasionne aucune génération d'Ang II intra ou extracellulaire. Ainsi, le récepteur M6P-R est un récepteur de clairance de la rénine plutôt qu'un récepteur activant la prorénine. [26,27] Or, en 2002, l'équipe du Dr. Nguyen a cloné un récepteur liant autant la rénine que la prorénine, soit le (pro)renin receptor (PRR). En se liant à ce récepteur, l'efficacité catalytique de la rénine vis-à-vis l'AoG est augmentée. En effet, le  $K_m$  de la rénine soluble dans le plasma pour son substrat est de 1 mM versus 0.15 mM pour la rénine liée à son récepteur. [28] De plus, la prorénine est activée par le PRR de manière réversible, c'est-à-dire sans la nécessité du clivage du prosegment. En se liant au PRR, la prorénine est plutôt sujette à un changement de conformation qui permet l'accessibilité de l'AoG au site actif, ce qui cause une activation locale du

SRAA via la production d'Ang I. [28] Ainsi, le PRR et les voies rénines indépendantes expliquent en partie le SRAA tissulaire et cellulaire en absence de production locale de rénine.

La capacité du PRR à induire l'activation de la prorénine et à augmenter l'affinité de la rénine vis-à-vis son substrat fait de ce récepteur un acteur majeur au niveau de l'activation du SRAA. Ceci corrèle avec l'implication du PRR dans le développement des pathologies cardiovasculaires et rénales. [29,30] Ainsi, le PRR est une nouvelle cible thérapeutique pour contrer les effets pathologiques induits par une suractivation du SRAA. Par contre, au niveau pharmacologique, la rénine demeure une cible thérapeutique primordiale. Une avancée importante en ce sens fut réalisée en 2007 suite à la mise en marché du tout premier inhibiteur de la rénine, soit l'aliskiren. Cet inhibiteur s'est démarqué en premier lieu chez des patients souffrant d'hypertension puisqu'il a diminué significativement leur pression artérielle de manière dose-dépendante. [31]

### **1.3 L'enzyme de conversion de l'angiotensine**

La molécule primordiale au niveau du SRAA est l'AoG puisqu'elle est l'unique précurseur des peptides de la famille angiotensine. L'AoG est clivé principalement par la rénine et la prorénine, mais également par d'autres peptidases, afin de former l'Ang I, un peptide inactif. Ce dernier est transformé en Ang II, un peptide bioactif, par ACE.

#### **1.3.1 ACE**

ACE a été découverte en 1956, par Skeggs Jr. et son équipe. Elle est une métallopeptidase et la première fonction qui lui fut associée est un rôle exopeptidase envers le décapeptide Ang I. ACE convertit l'Ang I en l'octapeptide Ang II via le clivage du dipeptide His-Leu retrouvé en C-terminal de l'Ang I. [32] Elle est donc à l'origine de la dernière étape à la formation de la molécule vasoconstrictrice conventionnelle du SRAA, soit l'Ang II. ACE est une glycoprotéine monomérique répartie au niveau de tous les tissus et organes, mais retrouvée plus particulièrement en concentration élevée dans les poumons. L'enzyme est synthétisée au niveau des



cellules endothéliales comme protéine membranaire, mais elle est également retrouvée dans le plasma suite à son clivage par des protéines membranaires de type sheddase et sécrétase. [33,34]

La bradykinine est un peptide produit suivant l'activation du système kinine-kallikréine. L'une des fonctions qui lui est associée est l'induction de la vasodilatation des CMLV. Cet effet résulte notamment de la liaison de la bradykinine à son RCPG de type B2 à la surface des cellules endothéliales. En fait, cette association induit des cascades de signalisation au sein des cellules endothéliales qui provoquent la synthèse et la libération d'oxyde nitrite (NO), soit un puissant vasodilatateur pour les CMLV. [35] Les docteurs Jonh Vane et Sergio Ferreira, ont démontré au cours des années 1960 que le venin d'un crotale brésilien augmentait la capacité de la bradykinine à induire la vasodilatation des CMLV. À l'inverse, ils démontrèrent que cette même substance diminuait l'efficacité d'ACE et conséquemment la production d'Ang II. Ils conclurent donc que le venin du serpent contenait des molécules pronant la dilatation des CMLV. Un lien direct entre ACE et la bradykinine fut dès lors démontré. En effet, l'équipe de Ferreira isola les peptides augmentant l'efficacité de la bradykinine par des méthodes de bioanalyse et l'équipe de Vane isola les peptides inhibiteurs d'ACE par spectrométrie de masse. Il s'avéra que ces peptides étaient les mêmes, mais qu'ils n'avaient pas la capacité d'augmenter par eux-mêmes l'efficacité de la bradykinine ; cette augmentation était plutôt directement corrélée à l'inhibition d'ACE. Un second substrat lui fut alors identifié puisque des recherches subséquentes démontrèrent qu'ACE inactivait la bradykinine en clivant le dipeptide Phe-Arg retrouvé en son C-terminal. Ainsi, ACE contribue non seulement à la vasoconstriction des CMLV en transformant l'Ang I en Ang II, mais également en inhibant l'effet vasodilatateur de la bradykinine sur ces mêmes cellules. Une dérégulation de l'activité de cette enzyme est donc associée à certaines maladies cardiovasculaires puisque sa suractivation est à l'origine d'une hyper-vasoconstriction des vaisseaux et conséquemment d'une élévation anormale de la pression artérielle. Un des peptides isolés du venin, soit le teprotide, fut le premier inhibiteur d'ACE à être étudié au niveau de patients hypertendus. Le teprotide occasionna la diminution

de la pression sanguine des patients, mais ne fut jamais mis sur le marché dû à sa non-biodisponibilité orale. [36,37]

ACE est un effecteur clé au niveau de la vasoconstriction des cellules musculaires et donc des vaisseaux sanguins. Par contre, elle n'est pas seulement une enzyme à l'origine d'effets presseurs, mais est également impliquée au niveau de plusieurs autres activités biologiques. En effet, en agissant en tant qu'endopeptidase vis-à-vis la substance P et la neurotensine elle participe à diverses fonctions cellulaires au sein du cerveau et du système nerveux. Également, ACE régule le système digestif via l'hydrolyse de la cholecystokinine et de la gastrine. Elle est aussi très étudiée dans la maladie d'Alzheimer, car elle a un effet bénéfique en prévenant l'accumulation de plaques amyloïdes. [38] Les premiers inhibiteurs d'ACE ont donc été réétudiés, puisque l'inhibition de l'enzyme n'était plus spécifique à la diminution de son effet vasoconstricteur. Diverses études de cristallographie ont permis d'identifier deux régions catalytiques au niveau de l'enzyme, une opportunité pour développer des inhibiteurs ou activateurs spécifiques à certains substrats. [39] Une des régions catalytiques de l'enzyme se trouve en C-terminal et la seconde en N-terminal. Le site de clivage le plus efficace pour l'Ang I *in vivo* se trouve en C-terminal. [40]

Cependant, suite aux études du développement d'inhibiteurs visant ACE, il a été déterminé qu'elle produisait seulement de 30 à 40% de l'Ang II, la contrepartie étant attribuée à une signalisation dite ACE-indépendante. Ainsi les protéases, telles la chymase, la cathepsine B et la trypsine ont la capacité de cliver l'Ang I en Ang II, ce qui diminue l'efficacité des inhibiteurs d'ACE comme l'énalapril vis-à-vis les effets pathologiques liés au SRAA. [23]

### **1.3.2 ACE2**

En 2000, deux groupes de recherche indépendants ont cloné un homologue d'ACE, soit l'enzyme de conversion de l'Ang II (ACE2). [41,42] Tout comme ACE, cette enzyme est une glycoprotéine transmembranaire exprimée au niveau des cellules endothéliales, pouvant être relarguée dans le plasma suite à son clivage. Elle est exprimée en majeure partie au niveau des reins, mais est exprimée dans tout

l'organisme. [43] Les séquences d'ACE et d'ACE2 sont à 42% homologues. ACE2 n'a qu'un seul domaine catalytique comparativement à ACE et sa fonction principale est de réguler négativement le SRAA. [44] ACE2 clive un résidu de l'Ang II pour former l'Ang (1-7), un peptide qui induit des effets opposés aux réponses produites par la liaison de l'Ang II à AT1, soit des réponses fréquemment associées à diverses pathologies SRAA-dépendantes.

Ainsi, ACE et ACE2 représentent les enzymes homéostasiques du SRAA, c'est-à-dire que leurs fonctions opposées modulent la régulation de l'équilibre entre les effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs induits par le SRAA. Un déséquilibre au niveau de l'activité de l'une ou l'autre des enzymes est directement lié à des dysfonctions rénales et cardiovasculaires. [45] Puisque la disparité entre les deux enzymes est plus élevée que leur homologie, les inhibiteurs d'ACE n'affectent aucunement l'activité d'ACE2. Le développement de traitements permettant simultanément l'inhibition d'ACE et l'activation d'ACE2 est donc l'objectif de plusieurs groupes de recherches. [39]

## **1.4 Les peptides de la famille angiotensine et leurs récepteurs couplés aux protéines G**

Les nombreuses recherches effectuées au niveau du SRAA classique ont conduit à la découverte des récepteurs AT1 et AT2 ainsi qu'à l'identification d'autres métabolites actifs produits lors des processus enzymatiques menant à la formation de l'Ang II.

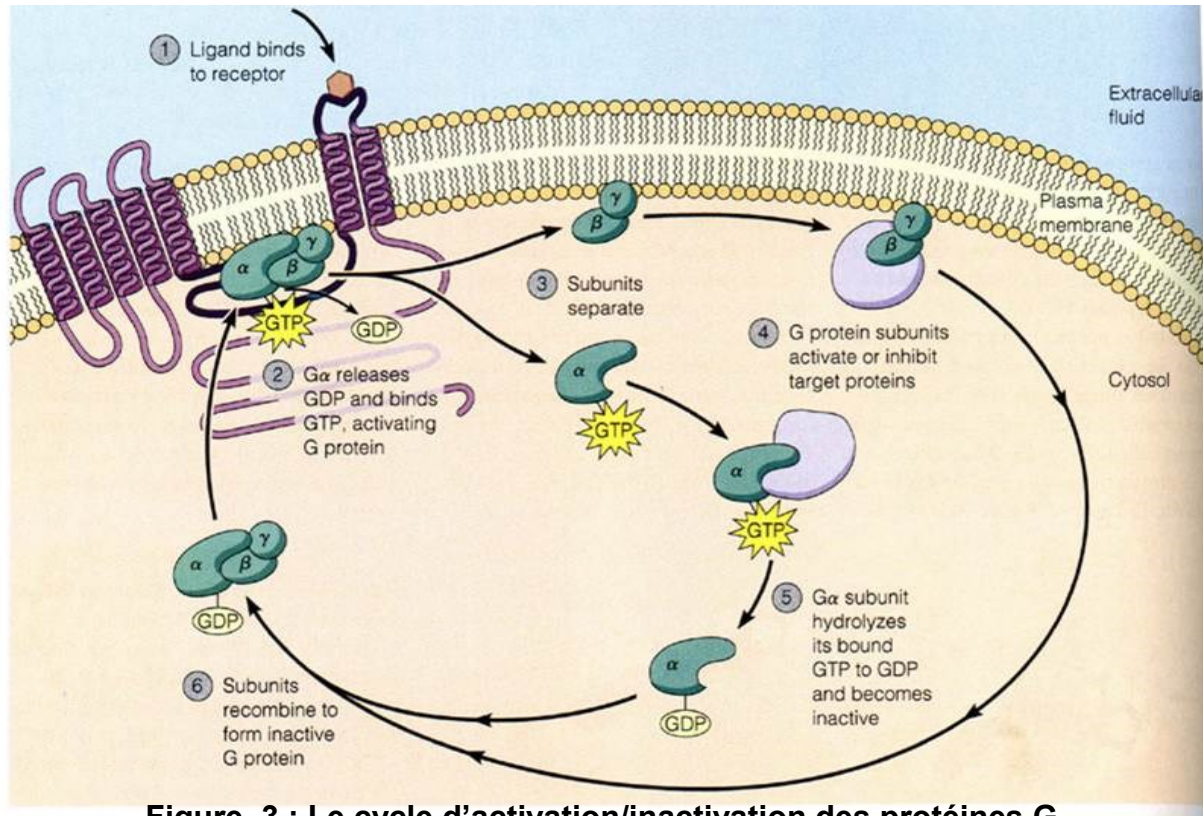
### **1.4.1 L'Ang II et les récepteurs AT1 et AT2**

L'Ang I est le premier peptide de type angiotensine produit au cours du déroulement du SRAA suite au clivage de l'AoG par diverses enzymes, dont la rénine. Par contre, aucun rôle bioactif ne lui a été associé, cependant il est le précurseur du premier peptide bioactif identifié au niveau du SRAA, soit l'Ang II. Ce dernier est un octapeptide (Ang-(1-8)) et est produit suite au clivage du décapeptide Ang I par diverses peptidases, telle ACE. L'Ang II se lie à deux types de récepteurs membranaires, soit les récepteurs AT1 et AT2, le  $K_D$  de l'octapeptide est inférieur à 1

nmol/L vis-à-vis ces derniers. L'affinité des récepteurs AT1 et AT2 pour l'Ang II est donc élevée. [46] Ces récepteurs sont exprimés dans tous les tissus à l'exception des poumons, du foie et du placenta où seul AT1 est exprimé. De plus, AT1 prédomine au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, du cerveau, des surrénales et des reins. Le récepteur AT2 est exprimé en majorité au niveau des tissus fœtaux où il exerce un rôle essentiel au bon développement de l'être en devenir lors de la gestation, mais son expression diminue rapidement à la naissance. [47] AT1 et AT2 appartiennent à la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG).

#### **1.4.1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G**

Les RCPG sont les cibles thérapeutiques les plus visées par les médicaments présentement sur le marché. Ils représentent 3,4 % du génome et forme ainsi la plus grande famille de récepteurs membranaires. Ils possèdent tous un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal cytoplasmique intercalés par sept boucles transmembranaires. Les protéines G sont les principales partenaires des RCPG. Elles sont formées de trois sous-unités, soit  $G\beta$  et  $G\gamma$  qui forment un complexe indissociable ( $G\beta\gamma$ ) ainsi que  $G\alpha$ . La nature de la sous-unité  $G\alpha$  détermine généralement la spécificité de la cascade de signalisation puisque cette dernière induit un effecteur spécifique suite à la liaison d'un agoniste donné à son RCPG. Les principaux types de sous-unités  $G\alpha$  sont  $G\alpha_s$ , qui active l'adénylate cyclase,  $G\alpha_i$ , qui inhibe l'adénylate cyclase,  $G\alpha_q$ , qui stimule la phospholipase C et  $G\alpha_{12/13}$ , qui est impliquée entre autres dans la régulation du cytosquelette et des jonctions cellulaires. [48] La protéine G doit cependant être activée pour moduler un effecteur. Cette activation s'effectue lors de la liaison du RCPG à la protéine G (Figure. 3). Ce contact induit, au niveau de la sous-unité  $G\alpha$ , l'échange d'une molécule de guanosine diphosphate (GDP) pour une molécule de guanosine triphosphate (GTP). La liaison du GTP au site actif de la sous-unité  $G\alpha$  cause la dissociation de cette dernière du complexe  $G\beta\gamma$ . Les sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  sont alors libres de moduler leurs effecteurs. Le concept selon lequel les RCPG s'associent aux protéines G seulement lors de leur stimulation par un agoniste est dépassé. En effet, de nombreux travaux



**Figure. 3 : Le cycle d'activation/inactivation des protéines G.**

(1) Lorsqu'un ligand lie un RCPG (2) ce dernier s'associe à la protéine G. Il y a alors échange du GDP pour du GTP au niveau de la sous-unité Gα (3) ce qui cause la dissociation entre la sous-unité Gα ainsi que le complexe Gβγ et conséquemment (4) l'initiation du signal. (5) Éventuellement, la sous-unité Gα hydrolyse le GTP en GDP et devient dès lors inactive. (6) Les sous-unités reforment un trimère inactif. GDP: guanosine diphosphate; GTP: guanosine triphosphate. *Hardin J, et al. (2012) Becker's world of the cell. 8th ed. Boston: Benjamin Cummings*

démontrent que les RCPG fonctionnent plutôt selon un modèle à deux états puisqu'ils possèdent un niveau d'activation et de désactivation intrinsèque. Ainsi, en l'absence d'agoniste les RCPG sont en constant équilibre entre un état actif et un état inactif, c'est-à-dire, couplés ou non aux protéines G. Les RCPG sont donc à l'origine d'une signalisation basale qui est accentuée lors de leur liaison à un agoniste. De plus, à l'état actif, ils sont dans une conformation de haute affinité pour ce dernier, tandis qu'à l'état inactif, ils adoptent une conformation de très faible affinité. [49]

Les RCPG régulent non seulement l'activation de voies de signalisation, mais également leur propre activité par une régulation négative. Cette dernière permet de contrôler la durée et l'intensité de l'activation des voies de signalisation afin d'éviter les effets indésirables liés à une stimulation prolongée du récepteur. La régulation négative nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine G qui s'effectue suite à la phosphorylation de résidus sérines et/ou thréonines au niveau de l'extrémité intracellulaire du récepteur. Selon le type de récepteur, ce découplage est suivi ou non du recrutement de la machinerie d'endocytose qui permet la formation de vésicules enduites de clathrine, indispensable à l'internalisation du récepteur. [49]

#### **1.4.1.2 L'Ang II et le récepteur AT1**

Le RCPG de type AT1 fut cloné à l'orée des années 1990 et les voies de signalisation les plus détaillées qu'il induit sont impliquées dans la vasoconstriction cellulaire. [50] Afin de réguler cette fonction au niveau des CMLV, le récepteur AT1 s'associe aux sous-unités G $\alpha_q$ , G $\alpha_i$  et G $\alpha_{12/13}$ . En effet, suivant la liaison de l'Ang II à ce RCPG, la sous-unité G $\alpha_q$  active la phospholipase C qui hydrolyse subséquemment le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate, soit deux seconds messagers à l'origine de la contraction des CMLV. La sous-unité G $\alpha_i$  quant à elle inhibe l'adénylate cyclase, ce qui résulte en une diminution de la production du second messager adénosine monophosphate cyclique (AMPc), soit un vasodilatateur. Ainsi, lors de l'activation de cette sous-unité les CMLV sont plus enclines à la vasoconstriction. En ce qui concerne la sous-unité G $\alpha_{12/13}$ , elle induit l'ouverture des canaux calcique de type L et permet ainsi l'influx de calcium du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire ce qui favorise la contraction cellulaire. [51]

La liaison de l'Ang II au récepteur AT1 dans les CMLV est également couplée à des voies de signalisation qui ne sont pas impliquées dans la régulation de leur état contractile, mais plutôt dans leur croissance, leur migration et leur état inflammatoire. Ces voies sont dépendantes de diverses protéines kinases dont les mitogen-activated protein kinases (MAPK). L'activation de ces dernières par l'Ang II repose en partie sur la capacité du récepteur AT1 à transactiver des récepteurs de type

tyrosines kinases, tel le récepteur epidermal growth factor. [52] La compréhension des processus moléculaires à l'origine des propriétés contractiles, migratoires, inflammatoires et hypertrophiques de l'Ang II est importante puisque ces dernières sont associées au développement de pathologies. Par exemple, la croissance incontrôlée et l'inflammation des CMLV provoquent un remodelage anormal au niveau de la vasculature qui est associé à de nombreuses maladies cardiovasculaires comme l'hypertension et l'athérosclérose. [53]

#### *1.4.1.2.1 Description sommaire de la désensibilisation et de l'internalisation du récepteur AT1*

La liaison d'une unique molécule d'Ang II au récepteur AT1 cause l'activation de plusieurs protéines G, chacune de ces protéines G active à leur tour plusieurs effecteurs et chacun de ces effecteurs conduit à la production de plusieurs seconds messagers, chacun de ces seconds messagers active plusieurs molécules spécifiques ce qui résulte en une production rapide à haute concentration du produit final. Ainsi, suite à son activation, le récepteur AT1, tout comme plusieurs autres RCPG, est rapidement désensibilisé et internalisé, afin de réguler l'amplification de la signalisation. La désensibilisation du récepteur AT1 est induite par la phosphorylation de résidus sérines/thréonines spécifiques localisés en son extrémité C-terminal. Cette phosphorylation est caractérisée par deux mécanismes distincts. En premier lieu, l'extrémité C-terminal d'AT1 est phosphorylée en 40 millisecondes par les G protein-coupled receptor kinases (GRK) et la présence de l'agoniste au récepteur est essentielle à ce processus. Cette désensibilisation, dite homologue, inhibe donc la signalisation causée par la liaison de l'Ang II à AT1. En second lieu, l'extrémité C-terminal est phosphorylée par les protéines AMPc dépendantes (PKA) et/ou les protéines kinases C (PKC). La phosphorylation n'est pas spécifique au couple ligand-récepteur mais cible plutôt tous les récepteurs de la cellule. Cette désensibilisation, dite hétérologue, prévient la signalisation plutôt que de l'inhiber puisqu'elle maintient le récepteur dans sa conformation non active, donc de faible affinité pour son ligand. Comparativement au GRK la cinétique de phosphorylation est lente, équivalente à un temps de demi-vie de 2 minutes. [54]

La phosphorylation de l'extrémité C-terminal d'AT1 est impliquée au niveau de la désensibilisation du récepteur, mais est également essentielle à son internalisation. En effet, la phosphorylation d'AT1 dépendante des GRK induit le recrutement rapide, soit en un temps de demi-vie de 30 secondes de la protéine  $\beta$ -arrestine. [55] Cette dernière permet à son tour le recrutement de la machinerie impliquée au niveau de l'endocytose du récepteur, ce qui résulte en son internalisation. [51] Par la suite, les vésicules d'endocytose guident le complexe ligand-récepteur aux endosomes, où le milieu acide engendre la dissociation du complexe. En contrepartie, la déphosphorylation du récepteur est occasionnée par des phosphatases intracellulaires. Suite à ces événements, la plupart des récepteurs sont recyclés à la membrane tandis que l'Ang II est délivrée aux lysosomes où elle est dégradée par des peptidases. [56] L'équipe du nobélien de chimie Dr. Robert Lefkowitz démontra en 2005 que bien que les  $\beta$ -arrestines sont associées à la désensibilisation soutenue et à l'internalisation du récepteur AT1, ces dernières ont également un rôle au niveau de l'induction de la signalisation cellulaire via leur fonction de protéines d'échafaudage. [57]

#### *1.4.1.2.2 Réponses cellulaires associées à l'activation du récepteur AT1 par l'Ang II*

Dépendamment du type cellulaire où le récepteur AT1 est activé, des réponses différentes mais spécifiques sont observées. Au niveau des cellules cardiaques, les voies de signalisation activées par la liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 sont impliquées dans leur développement, leur survie et leur contraction. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), elles sont impliquées dans leur croissance, leur contraction, leur survie et dans le réarrangement de leur cytosquelette. Au sein des cellules rénales, elles induisent le relargage d'aldostérone, l'inhibition de la production de rénine et l'absorption/réabsorption du sel et de l'eau. Ainsi, selon l'organe où ces dernières cellules se situent, le récepteur AT1 induit des processus physiologiques donnés, dont l'adaptation cardiaque, la régulation de la pression sanguine et l'homéostasie des fluides. Toutefois, puisque le récepteur AT1 a des propriétés hypertrophiques et inflammatoires, d'innombrables effets pathologiques lui sont associés lorsque son activation est perturbée, dont l'hypertrophie cardiaque lors



d'une dérégulation au niveau des cellules cardiaques, l'athérosclérose lors d'une dérégulation au niveau des CMLV et l'insuffisance rénale lors d'une dérégulation au niveau des cellules rénales. Ces pathologies peuvent être mortelles puisque l'hypertrophie cardiaque est associée en partie à la mort subite, l'athérosclérose principalement aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) ainsi que les infarctus et l'insuffisance rénale à la destruction irréversible des reins. [58,59] Le récepteur AT1 est donc à double tranchant, puisque ses effets physiologiques sont indispensables au maintien de la santé, mais que ses effets pathologiques sont dévastateurs.

Les antagonistes du récepteur AT1 (ARB) sont principalement prescrits lors d'hypertension artérielle, d'insuffisance cardiaque et d'insuffisance rénale. Le losartan fut le premier ARB mis sur le marché en 1995. Depuis l'approbation de ce dernier, sept autres ARB furent autorisés pour le traitement des pathologies associées à l'activation d'AT1. L'observance des patients vis-à-vis les ARB est plus élevée que vis-à-vis les inhibiteurs d'ACE puisque leurs effets secondaires sont moins contraignants. [60]

#### **1.4.1.3 L'Ang II et le récepteur AT2**

Le RCPG de type AT2 fut cloné en parallèle au récepteur AT1. Par contre, contrairement au récepteur AT1, le récepteur AT2 n'est couplé qu'à un seul type de protéine G, soit G $\alpha$ i. La composition en acides aminés d'AT1 et d'AT2 diffère largement puisque leur séquence en acides aminés n'est identique qu'à 32%. Leur affinité pour l'Ang II est cependant similaire. [47] Le récepteur AT2 représente 95% des récepteurs à l'Ang II exprimés au niveau des tissus fœtaux. Il exerce des fonctions primordiales dans le développement fœtal. À la naissance son expression diminue de 50% à 90%, selon les tissus. [47]

Les conséquences de la liaison de l'Ang II à AT2 chez l'adulte ont fait l'objet de nombreuses controverses. La majorité des scientifiques s'accorde toutefois pour dire que le récepteur AT2 antagonise le récepteur AT1. [61] Leurs études démontrent que la liaison de l'Ang II au récepteur AT2 induit la vasodilatation des vaisseaux, le relargage de NO, l'apoptose ainsi que l'inhibition de la croissance cellulaire, soit des effets physiologiques complètement opposés à ceux engendrés par le récepteur AT1

lors de son activation par l'Ang II. Les effets antagonistes du récepteur AT2 vis-à-vis le récepteur AT1 sont indirects puisque AT2 possède une signalisation qui lui est propre. À titre d'exemple, le récepteur AT2 inhibe la croissance cellulaire, non pas par l'inhibition des effecteurs hypertrophiques activés par AT1, mais par l'inhibition de l'expression de la cycline D1, une protéine du cycle cellulaire. [62] Par contre, le récepteur AT2 a également la capacité d'inhiber directement la signalisation induite par le récepteur AT1 en oligomérisant avec ce dernier. [63] Également inversement au récepteur AT1, le récepteur AT2 n'est pas soumis aux processus d'endocytose et donc d'internalisation. Par contre, lors de son activation son extrémité C-terminal est phosphorylée par les PKC au niveau du résidu sérine 534. Cette phosphorylation est à l'origine de la désensibilisation du récepteur, ce qui occasionne l'inhibition des cascades de signalisation induites suite à la liaison de l'Ang II à AT2. [64]

Au cours de l'année 2012, les études *in vivo* concernant le récepteur AT2 se sont multipliées suite à la découverte d'un agoniste AT2 oralement actif. Cet agoniste est un composé non peptidique spécifique et sélectif envers le récepteur AT2 dont la biodisponibilité est excellente. Des études ont été effectuées sur des modèles animaux développant diverses pathologies, tels l'hypertension, l'insuffisance rénale, les AVC et les infarctus du myocarde. Les recherches démontrent que les animaux ayant reçu le composé développent, pour chacune des pathologies étudiées, une protection au niveau des tissus atteints par la maladie. Des effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques sont également observés et résultent en une amélioration des pathologies. [65] Les agonistes AT2 représentent donc une nouvelle classe potentielle de médicaments pour les maladies liées à la suractivation du SRAA.

#### **1.4.2 Les dérivés bioactifs de l'Ang II : Ang III, Ang IV, Ang V et Ang (1-7)**

Le dogme selon lequel l'Ang II est le seul produit bioactif découlant du SRAA fut révoqué suite à plusieurs recherches ayant démontré qu'en addition à son rôle d'agoniste, l'Ang II est également le précurseur de plusieurs fragments bioactifs, soit l'Ang III (2-8), l'Ang IV (3-8), l'Ang V (3-7) et l'Ang (1-7).

#### **1.4.2.1 Le dérivé Ang III**

L'Ang III (2-8) est métabolisée à partir de l'Ang II par l'aminopeptidase A. Ce dérivé bioactif est primordial au niveau du SRAA puisqu'il participe à 55% du relargage de l'aldostérone par sa liaison au récepteur AT2 au niveau du rein versus 45% suivant la liaison de l'Ang II au récepteur AT1. [66] La fonction essentielle de l'aldostérone est la régulation de la balance hydrosodée et donc de la pression artérielle ; ainsi, la principale conséquence de la suractivation du récepteur AT2 par l'Ang III est une hyperaldostéronisme qui résulte à l'hypertension artérielle. Les études ciblant l'activation du récepteur AT2 en tant que cible thérapeutique pour contrecarrer les effets néfastes de l'activation d'AT1 par l'Ang II doivent prendre en considération la surcharge d'aldostérone, soit un effet indésirable de la suractivation d'AT2 par l'Ang III. [67]

L'Ang III est le peptide de type angiotensine le plus abondant au niveau du système nerveux central. Suite à sa liaison au récepteur AT1, l'Ang III augmente l'activité du système sympathique et en conséquence la sécrétion de noradrénaline qui est associée à l'augmentation de la libération de rénine et donc à l'activation du SRAA. [68] Il a également été démontré au niveau de plusieurs autres tissus, que suite à sa liaison au récepteur AT1, l'Ang III induit le même effet presseur que l'Ang II. [69] Or, l'affinité de l'Ang II vis-à-vis le récepteur AT1 est 62 fois plus élevée que celle de l'Ang III. [70]

#### **1.4.2.2 Les dérivés Ang IV et Ang V**

L'Ang IV (3-8) est générée à partir de l'Ang III par l'aminopeptidase N. [63] Son récepteur AT4 fut immédiatement identifié à la suite de la découverte du peptide en 1992. AT4 possède un site de haute affinité spécifique pour l'Ang IV, il fut donc initialement classé parmi les RCPG. Suite à sa purification en 2001, il fut toutefois démontré que le récepteur AT4 correspond plutôt à la protéine insulin-regulated aminopeptidase (IRAP), une enzyme transmembranaire délivrée à la membrane plasmique en réponse à l'insuline, dont l'extrémité extracellulaire est clivée et relarguée dans le plasma. [71] Ainsi, l'Ang IV est l'exception à la règle des dérivés bioactifs de l'Ang II puisque son récepteur n'est pas un RCPG.

La liaison de l'Ang IV à IRAP induit tout de même une signalisation ayant des répercussions similaires à d'autres peptides bioactifs de type angiotensine. En effet, l'Ang IV stimule l'hypertrophie et une réponse inflammatoire au niveau des fibroblastes cardiaques, des cellules endothéliales et des CMLV, ce qui lui confère un rôle dans les pathologies cardiovasculaires et rénales associées au SRAA. Malgré tout, la liaison de l'Ang IV à IRAP est également liée à des effets positifs dont le renversement des déficits mémoriels et l'induction de la régénération neuronale. Ainsi, bien que l'inhibition des effets induits par l'Ang IV soit une cible thérapeutique pour les maladies associées au SRAA, l'activation des effets de ce peptide représente également une avenue thérapeutique potentielle dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. [72,73]

L'Ang V (3-7) est générée à partir de l'Ang IV par l'aminopeptidase D. Son récepteur est toujours inconnu et peu d'études concernant l'Ang V sont disponibles. Les quelques données sur ce peptide démontrent qu'il a un effet presseur via l'activation du système nerveux sympathique et qu'il est impliqué au niveau du développement des réflexes ainsi que de la mémoire. [63,74]

#### **1.4.2.3 Le dérivé Ang (1-7)**

Le dérivé bioactif Ang (1-7) est produit suite au clivage par ACE2 d'un résidu phénylalanine au niveau de l'Ang II. Ce peptide est le dérivé bioactif du SRAA suscitant le plus d'intérêt dans la communauté scientifique puisqu'il s'oppose aux effets de la signalisation induite par la liaison de l'Ang II à AT1. Les cascades de signalisations dépendantes de l'association de l'Ang (1-7) à son RCPG, soit MAS sont peu caractérisées. Cependant, il est connu que l'axe Ang (1-7)/MAS s'oppose à la signalisation Ang II/AT1 en induisant le relargage de la prostaglandine E2, un vasodilatateur, et en activant la synthèse d'une protéine inhibant la libération de noradrénaline. De plus, ce métabolite augmente la libération de NO, accroît les actions de la bradykinine et inhibe la croissance des CMLV. [75] Qui plus est, suite à son activation, le récepteur MAS forme un hétéro-oligomère avec le récepteur AT1 inhibant ainsi les effets dépendants de l'Ang II. [76]

ACE2 régule donc négativement le SRAA en diminuant non seulement la biodisponibilité de l'Ang II via sa transformation en Ang (1-7), mais également en causant la formation d'un peptide dont les effets s'opposent à l'octapeptide. D'autre part, ACE 2 a la capacité de cliver l'Ang I en Ang (1-9), qui est ensuite transformée en Ang (1-7) par ACE et d'autres peptidases. Toutefois, l'affinité de liaison d'ACE2 vis-à-vis l'Ang I est 400 fois plus faible que son affinité pour l'Ang II. [43] Les recherches se concentrent donc sur le développement d'un éventuel activateur d'ACE2 pour la transformation de l'Ang II en Ang (1-7). [38]

## **1.5 L'aldostérone**

Ce ne fut qu'au cours des années 1950 que l'effecteur aldostérone fut identifié, dès lors le système-rénine-angiotensine fut rebaptisé SRAA. L'aldostérone est synthétisée à partir du cholestérol principalement au niveau de la zone glomérulée de la glande surrénale, suite à la liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 et/ou suite à la liaison de l'Ang III au récepteur AT2. Par contre, il a également été démontré en 1990 que l'aldostérone peut être produite au niveau de tissus extrarénaux tels que le cerveau, les tissus vasculaires et le myocarde. [77]

L'aldostérone se lie à un récepteur nucléaire de type minéralocorticoïde (MR) au niveau des cellules du tubule contourné distal du rein afin de réguler l'expression des gènes codant pour les protéines qui contrôlent la réabsorption de sodium et l'élimination du potassium. La fonction essentielle de l'aldostérone est donc la régulation de la balance hydrosodée plasmatique et subséquentement de la régulation de la pression artérielle. Le MR est aussi exprimé par les cellules épithéliales, les CMLV et les cellules cardiaques où il induit une réponse oxydative, une augmentation de leur sensibilité à la noradrénaline ainsi que des réponses hypertrophiques et inflammatoires. [78] Au sein de ces mêmes cellules, l'aldostérone augmente également l'expression du récepteur AT1, stimule la production de collagène et s'oppose aux effets vasodilatateurs induits par l'acétylcholine. La conjonction de ces réponses entraîne diverses pathologies, telles l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, l'encéphalopathie hypertensive et l'insuffisance rénale. [77] Deux antagonistes des MR sont actuellement disponibles sur le marché : la

spironolactone et l'éplérénone. La spironolactone est prescrite dans les cas d'hypertension artérielle tandis que l'éplérénone est prescrite pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Cette drogue a diminué de 32% la mortalité liée à cette pathologie. [79]

Il existe deux modes de rétroaction négative au niveau du SRAA. L'une est un effet inhibiteur direct de l'Ang II sur la sécrétion de rénine au niveau des cellules JG, la seconde est occasionnée par l'aldostérone, principalement par l'augmentation de l'expression de la pompe sodium-potassium au niveau des tissus rénaux. Ceci entraîne une rétention de sodium et d'eau et donc une augmentation de la pression artérielle au niveau de l'artériole afférente du rein, ce qui induit une extension de cellules JG et donc une inhibition de la sécrétion de rénine. [7]

## **2.0 Le SRAA revisité**

Le SRAA conventionnel est défini en tant que système endocrinien, c'est-à-dire que l'Ang II est sécrétée dans la circulation sanguine et exerce son action au niveau de cellules composant divers tissus. Bien que ce système systémique, soit bel et bien existant, les développements scientifiques entourant le SRAA conventionnel ont mené à l'observation que plusieurs types de cellules et de tissus ont la capacité de synthétiser leur propre Ang II. Ainsi, le SRAA est aujourd'hui décrit en tant que système endocrine, autocrine, paracrine et intracrine.

Plusieurs études démontrent une production locale d'Ang I, d'ACE, d'Ang I et d'Ang II, entre autres au niveau des reins, du cœur, de la vasculature, du tissu adipeux, du cerveau et du foie. Toutefois, la rénine n'est pas synthétisée localement. [18] Le PRR y est cependant exprimé, tout comme les enzymes ayant la même fonction que la rénine. Ils assurent donc la catalyse des SRAA cellulaires et tissulaires indépendamment de la présence de rénine. Tous les dérivés bioactifs de type angiotensine ainsi que leur récepteur sont également présents au niveau des SRAA locaux.

Les scientifiques estiment que les SRAA locaux régulent divers effets physiologiques et pathologiques au même titre que le SRAA systémique. La

compréhension du fonctionnement de ceux-ci suscite donc beaucoup d'intérêt auprès des scientifiques. De plus, les SRAA intrinsèques à trois organes, soit le rein, le cœur et la vasculature font l'objet de plusieurs études puisqu'ils sont impliqués au niveau des pathologies cardiovasculaires.

## **2.1 Le SRAA cellulaire : Un système autocrine/paracrine et intracrine**

Diverses cellules, dont les cardiomyocytes, les fibroblastes, les CMLV, les adipocytes, les macrophages et les leucocytes, ont la capacité de générer de l'Ang II au niveau de leur cytoplasme. La première réaction du SRAA cellulaire menant à la formation intracellulaire d'Ang II est catalysée par la rénine ayant diffusé dans la cellule. En addition à ce mécanisme qui est dépendant de la production systémique de rénine, l'AoG synthétisé par la cellule elle-même peut également être clivé par la cathepsine G, la tonine, le t-PA ainsi que la prorénine activée par un PRR cytosolique. Ces derniers effecteurs sont tous synthétisés directement dans la cellule. L'Ang I est par la suite transformé en Ang II par ACE, la chymase, la cathepsine B et la trypsine également synthétisés au niveau cellulaire. [18,80]

Le SRAA cellulaire est associé à une signalisation de type autocrine/paracrine et de type intracrine. Les mécanismes à l'origine de la formation de l'Ang II dans le cytoplasme sont identiques dans les deux cas, la distinction entre ces concepts est plutôt définie par le devenir de l'Ang II. En effet, le SRAA menant aux effets autocrines/paracrines est caractérisé par l'excrétion de l'Ang II du milieu intracellulaire au milieu interstitiel, contribuant ainsi à la formation locale d'Ang II au niveau de divers tissus. [18] Le système intracrine est défini quant à lui par la capacité de l'Ang II à moduler l'expression des gènes. [81]

L'hypothèse d'un SRAA associé à des effets intracrines fut établie en 1972, mais ce concept fut abordé plus sérieusement par les scientifiques que plusieurs années plus tard, soit en 2000. Les effets intracrines de l'Ang II dépendent de sa liaison à la chromatine ainsi que de sa liaison au récepteur AT1 retrouvé à la membrane nucléaire. [82] Les gènes modulés par l'Ang II sont impliqués, entre autres, dans les communications intercellulaires et dans la croissance cellulaire. Par ailleurs, l'Ang II module directement l'expression de l'AoG et du récepteur AT1 au

niveau de l'ADN, ce qui contribue à une constante activation du SRAA cellulaire. [81] Ainsi, les effets intracrines de l'Ang II en condition physiologique régulent en partie les dynamismes intercellulaires et l'homéostasie de la synthèse protéique.

D'autre part, le SRAA intracrine semble également associé à des effets pathologiques. L'une des équipes de recherche caractérisant le SRAA intracrine a surexprimé, dans un modèle de souris, de l'Ang II qui se trouve séquestré au niveau des cardiomyocytes. Aucun changement dans la concentration systémique de l'Ang II ni aucune augmentation de la pression artérielle ne furent observés. Toutefois, les cardiomyocytes ont développé une hypertrophie pathologique et subissent l'apoptose. [83] En addition à cette étude, il a été démontré que la concentration d'Ang II est cinq fois plus élevée dans le noyau de diverses cellules chez des patients souffrant d'hypertension. [84] Malgré ces indices, la continuité des études concernant le SRAA intracrine est de mise afin de déterminer si ce système est bel et bien impliqué dans le développement de pathologies. Si tel est le cas, la recherche pour le développement de drogues permettant l'inhibition des effets intracrines de l'Ang II est requise, puisque ces effets ne sont pas influencés par les inhibiteurs d'ACE et par les ARB, ces derniers ne pouvant diffuser dans les cellules. [85]

Ainsi, les fonctions pathophysiologiques associées au SRAA peuvent être occasionnées par une synergie des actions endocrines, autocrines, paracrines et intracrine de l'Ang II.

## **2.2 Le SRAA tissulaire**

La cellule est l'unité fonctionnelle de la vie et un ensemble de plusieurs milliers de cellules forme un tissu. Puisque le SRAA cellulaire est caractérisé par l'excrétion de l'Ang II dans le milieu interstitiel il participe donc au pool d'Ang II produit au niveau des tissus, mais la majorité de l'Ang II locale est formée directement dans les régions extracellulaires. En effet, il s'y retrouve la rénine et la prorénine qui diffusent de la circulation aux tissus, la prorénine qui est produite localement ainsi qu'ACE qui est exprimée à la surface des cellules formant le tissu. En addition à ces derniers, la cathepsine G, la tonine et le t-PA ainsi que la chymase, la cathepsine B et la trypsine



qui sont les analogues respectifs de la rénine et d'ACE, sont présents dans le milieu interstitiel. [18]

### 2.2.1 Le rein

En 1982, le Dr. Keilbach et son équipe furent les premiers à évoquer l'existence d'un SRAA intrinsèque au rein à la suite d'études d'immunocytochimie qui révélèrent la présence soutenue de rénine, d'ACE et d'Ang II au niveau de certaines régions spécifiques du rein. Leur conclusion sur la potentialité d'un SRAA intrarénal se base donc sur l'expression constante de certaines composantes du SRAA systémique à des endroits très précis du rein. [86] Suite à cette étude, plusieurs autres scientifiques ont publié des éléments appuyant l'existence d'un SRAA intrarénal. Ces études ont fait l'objet de plusieurs revues scientifiques, dont celle de Kobori *et al.* [87]

Puisque le rein est le seul organe ayant la capacité de synthétiser la rénine, le SRAA local qui lui est associé est unique en son genre puisqu'il fait exception à la règle selon laquelle cette enzyme n'est pas produite localement. Ainsi, la conversion locale de l'AoG en Ang I dans le rein est principalement catalysée par la rénine elle-même. Celle-ci diffuse des cellules JG aux autres cellules rénales. [7] L'AoG et l'Ang I sont délivrés au niveau des régions interstitielles des tissus rénaux suite à leur production dans le foie et le plasma respectivement. Par contre, bien qu'il y ait une fraction systémique d'AoG dans ces tissus, la concentration rénale de cette protéine est majoritairement constituée de l'AoG qui est synthétisé et excrété par les cellules du tubule proximal du rein. L'AoG interstitiel est par la suite transformé en Ang I par la rénine. Ainsi, la concentration tissulaire en Ang I est composée en majorité du peptide formé localement et non de celui provenant de la circulation. L'Ang I est clivé en Ang II via l'action d'ACE qui est exprimée au niveau des cellules épithéliales des reins. L'Ang II formée localement au niveau des interstices cellulaires peut ainsi exercer des effets autocrines et/ou paracrines. [87]

La concentration intrarénale de l'Ang II est de 10 nM tandis que sa concentration plasmatique est de 30 pM. [88,89] La concentration d'Ang II au niveau du rein est donc 300 fois plus élevée qu'au niveau systémique. Cet aspect a suscité de l'intérêt sur la démystification de l'apport du SRAA intrarénal au niveau physiologique. Une

des nombreuses études associant effectivement des fonctions physiologiques au SRAA intrarénal fut effectuée dans un modèle de souris transgéniques exprimant de manière inductible l'AoG, spécifiquement dans le rein. L'induction de la synthèse d'AoG uniquement dans le rein causa à elle seule une augmentation de la pression artérielle. Cette dernière est donc indépendante de l'activation du SRAA systémique ou de tout autre SRAA local, démontrant ainsi une fonction majeure du SRAA intrarénal au niveau de la régulation de la tension artérielle. [90] Une seconde étude démontra que l'infusion locale d'un ARB ou d'un inhibiteur d'ACE dans les reins de souris, à des concentrations n'ayant aucune répercussion sur les paramètres hémodynamiques systémique et n'affectant aucunement le taux plasmatique d'aldostérone, diminue significativement la réabsorption d'eau. Ainsi, la réabsorption et la sécrétion tubulaire s'effectuent en l'absence de l'activation du SRAA systémique, elles dépendent donc majoritairement du SRAA intrarénal. [91]

Malgré les fonctions physiologiques essentielles associées au SRAA intrarénal, une stimulation soutenue de ce dernier est associée à une prolifération cellulaire accrue et à la fibrose, ce qui occasionne un remodelage des tissus rénaux qui est à l'origine de diverses maladies, telles l'hypertension, l'insuffisance rénale et la néphropathie diabétique. Ces pathologies peuvent donc se développer sans qu'il y ait de changements au niveau du SRAA circulant, ce qui révèle l'importance des SRAA locaux au niveau pathologique. [87] Les effets des inhibiteurs du SRAA ont été démontrés comme étant efficaces pour l'inhibition du SRAA intrarénal. Par exemple, l'administration systémique d'ARB à des rats hypertendus a diminué la synthèse intrarénale de l'AoG. [92] L'administration en combinaison d'un ARB et d'un inhibiteur d'ACE a également diminué la production intrarénale d'Ang II. [93]

### **2.2.2 Le cœur**

L'existence d'un SRAA intracardiaque est supportée par le fait que tous les acteurs du SRAA systémique sont exprimés au niveau cardiaque. De plus, la concentration de l'Ang II intracardiaque est de 2.2 nM, soit une concentration 70 fois plus élevée que dans le plasma. [94] Afin de s'assurer que cette disparité est attribuable à une synthèse de l'Ang II au niveau cardiaque et non pas à un stockage

de l'Ang II provenant de la circulation, plusieurs expériences *in vivo* ont été effectuées. Notamment, de l'Ang I et de l'Ang II radiomarquées ont été administrées à des cochons directement dans le plasma. Le taux tissulaire versus le taux plasmatique des radioligands a par la suite été déterminé. Les résultats montrent que plus de 90% de l'Ang I et que plus de 75% de l'Ang II retrouvés au niveau des tissus cardiaques ne sont pas radiomarquées. Ainsi, l'Ang I et l'Ang II sont produits directement au niveau des régions interstitielles des tissus cardiaques. [95]

Puisque la prorénine et la rénine ne sont pas produites au niveau intracardiaque, ces dernières diffusent du plasma aux tissus cardiaques. Par contre, une forte densité de PRR membranaires est exprimée par la majorité des cellules du cœur. Ainsi, la prorénine est activée localement et contribue majoritairement à la catalyse du SRAA intracardiaque par le clivage de l'AoG provenant directement de la circulation ou produit et excrété par les cellules cardiaques. Les voies alternatives de la rénine participent également à la formation d'Ang I interstitiel. [96] En ce qui concerne ACE, elle est exprimée à la surface cellulaire des mastocytes cardiaques et des cardiomyocytes. Par contre, la synthèse de l'Ang II par cette enzyme ne participe qu'à 11% de la production local d'Ang II, la contrepartie étant produite par une autre enzyme, soit la chymase. Il y a donc une voie intracardiaque alternative pour la formation de l'Ang II. Puisque la chymase n'est pas inhibée par les inhibiteurs d'ACE, cette voie alternative doit être prise en considération lors des traitements des pathologies associés au SRAA intracardiaque. [97]

La fonction physiologique prédominante de la liaison de l'Ang II localement formée à son récepteur AT1 intracardiaque est la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire en réponse à divers stress au niveau du myocarde, tels un étirement soutenu des cardiomyocytes et une ischémie. Ce SRAA tissulaire participe également à la régulation des effets inotropiques cardiaque. Il a été démontré que ces deux fonctions interviennent en absence de l'activation du SRAA systémique ; ainsi le SRAA intracardiaque induit à lui seul des effets physiologiques essentiels au maintien des activités cardiaques. [4]

L'induction de la croissance cellulaire par le SRAA intracardiaque est donc associée en premier lieu à une adaptation bénéfique. Cette hypertrophie favorable

affecte les différents types cellulaires du myocarde, dont les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Par contre, l'hypertrophie est intimement liée au remodelage cardiaque. Alors, bien qu'elle corresponde initialement à un effet compensatoire, elle est à long terme un facteur de risque au remodelage ventriculaire. Elle cause donc fréquemment une dysfonction ventriculaire dont la conséquence pathologique est l'insuffisance cardiaque. En plus de l'hypertrophie, le SRAA intracardiaque participe à l'augmentation du dépôt de collagène et à l'apoptose des cardiomyocytes, soit deux événements contribuant également au remodelage ventriculaire. Finalement, en condition pathologique, le SRAA intracardiaque induit un dérèglement au niveau de l'homéostasie ionotropique du cœur, ce qui occasionne des arythmies ventriculaires et auriculaires. [4,98] Ainsi, bien que le SRAA intracardiaque ait des fonctions essentielles au bon fonctionnement du cœur, ses effets pathologiques sont dévastateurs. En effet, l'insuffisance cardiaque est le facteur de risque le plus important de la mort subite. [99] De plus, le débalancement de l'équilibre électrique cardiaque peut occasionner des torsades de pointes dont la plus importante conséquence est l'arrêt cardiaque. [100] Il semble donc essentiel de s'assurer de cibler le SRAA intracardiaque, lors des traitements pour ces pathologies. À juste titre, les inhibiteurs du SRAA systémique, tels les ARB et les inhibiteurs d'ACE ont un effet direct sur le SRAA tissulaire cardiaque. [4] En effet, une infusion soutenue d'Ang II au niveau des tissus intracardiaques de rats induit la nécrose des cardiomyocytes et la prolifération des fibroblastes qui sont toutes deux inhibées par un inhibiteur d'ACE. [101]

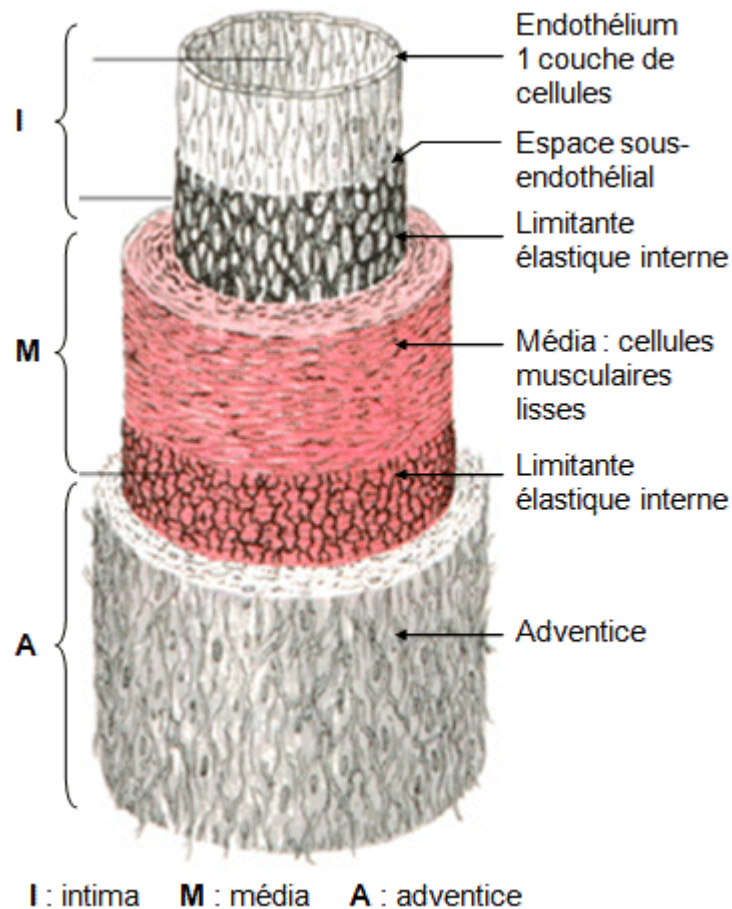
### **2.2.3 Le système vasculaire**

L'hypothèse d'un SRAA intravasculaire et d'une fonction autocrine/paracrine de l'Ang II produit localement au niveau de la vasculature fut proposée avec données à l'appui dans les années 1990.

#### **2.2.3.1 Les vaisseaux sanguins**

Le système vasculaire inclut la circulation lymphatique et la circulation sanguine. Le transport du plasma au niveau de tout l'organisme est assuré par quatre types de vaisseaux sanguins, soit les artères, les artérioles, les vaisseaux capillaires et les

veines. Les artères sont les vaisseaux transportant le sang du cœur aux divers organes. Il y a les artères élastiques qui tempèrent les élévations pression lors de la systole qui sont suivies des artères musculaires qui assurent la continuité de la distribution du sang. Elles sont toutes deux constituées de trois tuniques, dont l'intima qui est en contact directe avec le sang. (Figure. 4) Cette dernière est formée d'une monocouche de cellules épithéliales et d'une couche sous-endothéliale composée de tissu conjonctif lâche et de fibroblastes. [102] À noter que contrairement à la plupart des modèles animaux employés lors des études relatives au système vasculaire, l'intima des artères humaines contient également des CMLV résidentes. [103] La section centrale, soit la média est constituée de CMLV, de fibres de collagène et de fibres d'élastine. Finalement, il y a en périphérie l'adventice qui contient des fibres de collagène, des fibres d'élastine, des adipocytes, des fibroblastes et des vasa vasorum, soit des vaisseaux capillaires vascularisant la paroi artérielle. Les artères élastiques et musculaires ont des fonctions distinctes résultant de leurs particularités structurales. En effet, la média des artères élastiques comprend plusieurs dizaines de lames élastiques, disposées concentriquement autour de la lumière du vaisseau puisque leur rôle est d'amortir l'ondée systolique, et de transformer le débit cardiaque discontinu en courant sanguin semi-continu. La paroi emmagasine donc une partie de l'énergie mécanique communiquée par le cœur à l'ondée systolique pour la restituer lors de la diastole. La média des artères musculaires comporte quant à elle une trentaine de strates de CMLV puisque ces vaisseaux modifient leur calibre afin d'assurer la persistance de la circulation sanguine. [102] Les artères musculaires se ramifient en artérioles, des vaisseaux dont la composition des tuniques est semblable à celle des artères musculaires, mais qui ne contiennent que deux strates de CMLV et dont le diamètre est environ deux cents fois plus petit. La paroi des artérioles est fortement innervée par le système nerveux sympathique, et leur contraction occasionne à la fois une réduction du flux sanguin tissulaire et une augmentation de la résistance à l'écoulement plasmatique. Les plus petites artérioles déversent leur contenu dans le réseau capillaire. Ces vaisseaux sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales, d'une lame basale et de quelques fibres de collagène. C'est au niveau des capillaires que se font les échanges entre le sang et



**Figure. 4 : Structure d'une artère.**

Les artères sont constituées de trois tuniques, soit l'intima, la média et l'adventice qui forme un vaisseau où le sang circule du cœur aux organes. *Kahle W, et al. (1996) Atlas commenté d'anatomie humaine pour étudiants et praticiens. Tome 2 : Viscères. 2<sup>e</sup> Edition, 11<sup>e</sup> tirage Médecine-Sciences Flammarion (Paris-France)*

les tissus vascularisés. Ils constituent également le pont entre le système artériel et veineux. En effet, elles déversent le sang provenant des artères dans des veinules post-capillaires dont la composition est similaire aux capillaires, mais possédant en plus quelques fibres d'élastine. Le sang est par la suite déversé au niveau des veinules et finalement au niveau des veines, dont la structure est analogue aux artères. Les veines possèdent cependant des valvules anti-reflux qui facilitent la

progression à sens unique du sang, soit des organes vers le cœur. [4] Le système vasculaire est donc divisé en plusieurs sections qui possèdent toute une fonction relative à leur structure afin d'assurer une circulation sanguine constante et adéquate.

### **2.2.3.2 Le SRAA intravasculaire**

Le concept selon lequel l'Ang II est localement produite dans les tissus vasculaires est supporté par le fait que tous les éléments essentiels au SRAA y sont exprimés, à l'exception de la rénine, et qu'il y a une forte disparité entre les concentrations plasmatique et intravasculaire d'Ang II, soit 30 pM et 3.2 nM respectivement. [104] De plus, des études démontrent que la pression artérielle de patients hypertendus est diminuée de manière équivalente par les inhibiteurs d'ACE, les ARB et les bloqueurs des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, mais que seulement les inhibiteurs du SRAA ont la capacité de diminuer le remodelage vasculaire. Cette diminution est indépendante des changements hémodynamiques, donc du SRAA systémique, puisque le bloqueur des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques n'a aucun effet bénéfique au niveau de la vasculature bien qu'il diminue la pression artérielle tout comme les inhibiteurs du SRAA. [105,106] Ceci confirme donc l'existence d'un SRAA intravasculaire qui a une incidence directe sur la vasculature chez l'humain sans l'apport du SRAA systémique.

Bien que la prorénine ait un rôle majeur au niveau du SRAA systémique, il n'y a aucune augmentation de la pression artérielle à court terme chez des souris transgéniques exprimant 400 fois plus de prorénine circulante que chez des souris normales. Par contre, ces dernières développent rapidement de sévères lésions vasculaires, démontrant ainsi que la prorénine et le PRR sont deux effecteurs pathologiques du SRAA intravasculaire. [107] La prorénine circulante diffuse dans les interstices de la vasculature tandis que le PRR est exprimé directement par les cellules de la vasculature. Plus précisément, au niveau des artères, les trois types cellulaires les plus importants au SRAA intrinsèque à cette région sont les cellules endothéliales, les CMLV et les adipocytes. L'AoG est synthétisé et relargué par les adipocytes. Il diffuse ensuite au niveau des segments artériels et est transformé en Ang I par la prorénine liée à un PRR membranaire au niveau des cellules

endothéliales, des CMLV ou des adipocytes. L'Ang I localement formé est clivé en Ang II par ACE qui est principalement exprimée par les cellules endothéliales, mais qui peut également être exprimée par les CMLV en condition de stress, telles les contraintes de cisaillement. En plus des enzymes classiques, les voies rénine- et ACE-indépendantes contribuent aussi à la formation locale d'Ang II au niveau des artères. Finalement, l'Ang II localement synthétisée se lie, entre autres, à son récepteur AT1 exprimé par les cellules endothéliales, les CMLV et les fibroblastes. [4]

#### *2.2.3.2.1 Fonctions : Accent sur les cellules endothéliales et les CMLV*

La fonction physiologique du SRAA intravasculaire est la régulation de l'homéostasie de la contraction des artères. En effet, la liaison de l'Ang II au récepteur AT1 des CMLV induit leur contraction. De même, l'association de l'octapeptide au récepteur AT1 des cellules endothéliales induit la libération d'endothéline-1 qui a un effet vasoconstricteur au niveau des CMLV. Par contre, les cellules endothéliales en réponse à l'Ang II via AT1 induit également la synthèse et le relargage de prostaglandines E2 et de NO, soit deux effecteurs qui induisent la vasodilatation des CMLV. [108] En condition physiologique, ces deux types cellulaires régulent ainsi l'équilibre du tonus des artères en réponse à l'Ang II.

Or, une concentration en Ang II trop élevée au sein de la vasculature lui est néfaste. Cette affirmation est supportée par les effets bénéfiques que provoquent les inhibiteurs d'ACE et/ou les ARB chez plusieurs patients souffrant d'hypertension et d'athérosclérose. Les changements positifs observés sont dus en partie à l'inhibition de la signalisation induite par l'Ang II dans les cellules endothéliales, tel que discuté dans la revue de Watanabe T. *et al.* [109] En effet, l'Ang II contribue à la dysfonction endothéliale, caractérisée notamment par une diminution de la biodisponibilité de NO qui est non seulement un puissant vasodilatateur mais également une molécule anti-inflammatoire, anti-proliférative et anti-thrombotique. À titre d'exemple, l'Ang II suivant sa liaison aux cellules endothéliales induit l'activation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)-oxydase, une enzyme qui provoque une réaction d'oxydation à l'origine de la production de dioxygène oxydé ( $O_2^-$ ). Cette molécule interagit avec le NO pour former l'ion peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) qui

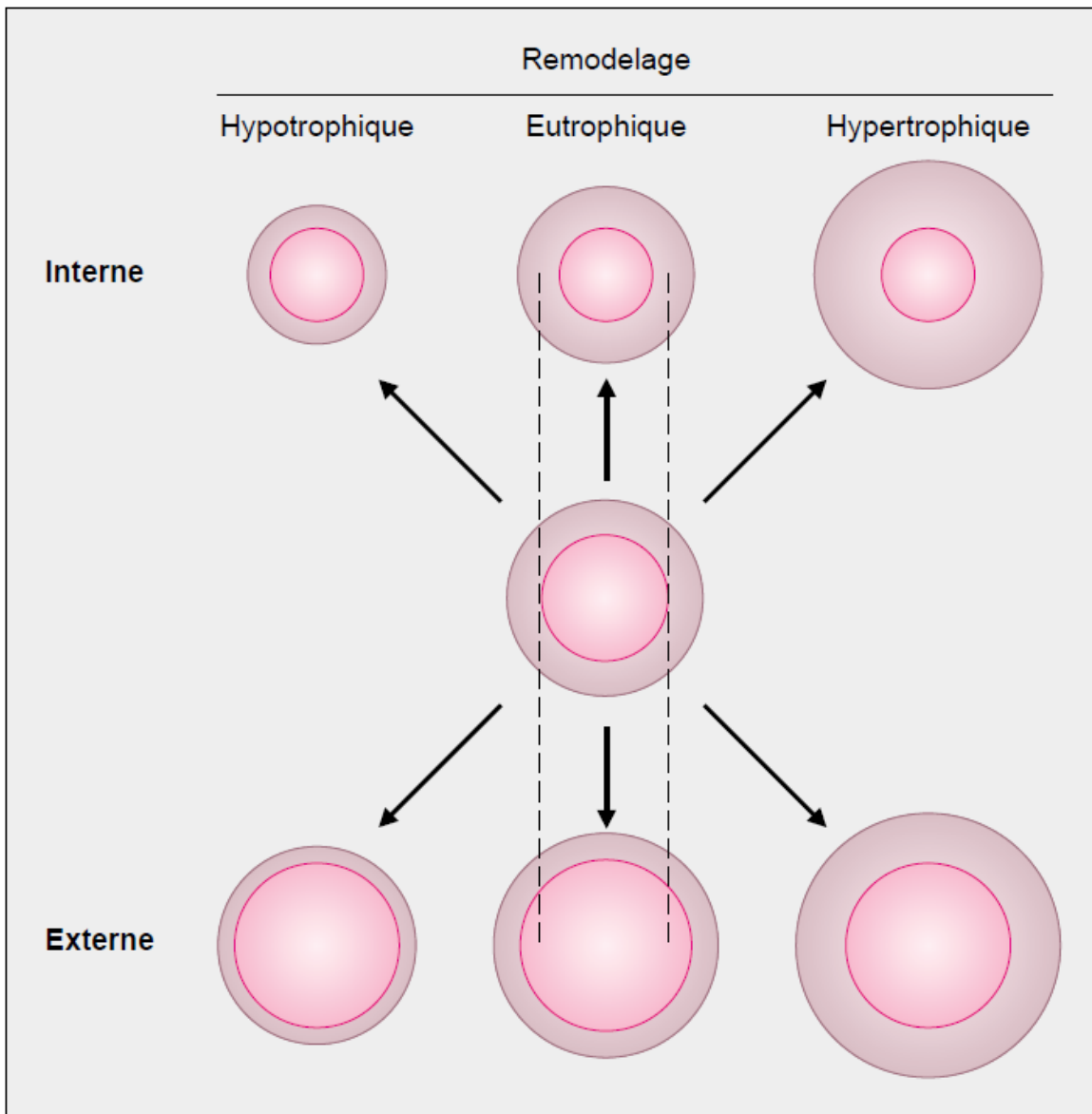


est un agent oxydant et inflammatoire ne possédant aucun pouvoir de vasodilatation. [110-112] L'Ang II diminue donc la biodisponibilité du NO tout en promouvant la synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces derniers, dont l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et le ONOO<sup>-</sup> constituent une famille de molécules impliquées dans plusieurs processus pathologiques tel que présenté dans la revue de Tamara M. *et al.* [113] De plus, l'Ang II au sein des cellules endothéliales induit l'expression de molécules inflammatoires, leur apoptose et contribue à l'augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale. [109] Les inhibiteurs d'ACE et/ou les ARB sont également bénéfiques en ce qui à trait la liaison de l'Ang II aux CMLV puisque l'octapeptide y induit non seulement des voies de signalisation menant à la contraction vasculaire, mais aussi à la production de ROS et à l'hypertrophie, l'inflammation, la migration ainsi que la division cellulaire. [18] Ainsi, bien qu'il soit essentiel à l'homéostasie vasculaire, le SRAA intravasculaire est aussi impliqué dans le développement de pathologies associées à un remodelage vasculaire, telles l'hypertension et l'athérosclérose.

### **2.2.3.3 Remodelage vasculaire**

Les vaisseaux sanguins formant l'arbre artériel sont des organes en mesure de percevoir et de répondre aux changements de leur environnement. Ils interprètent et intègrent ces derniers selon un mécanisme de communication autocrine-paracrine entre les cellules les composant, soit les cellules endothéliales, les CMLV et les fibroblastes. Les vaisseaux sont donc dynamiques et ainsi aptes à modifier leur structure et leur fonction au besoin. Ce processus de modification se nomme le remodelage vasculaire et implique quatre aspects, soit la production ou la dégradation de la matrice extracellulaire, la croissance cellulaire, l'apoptose ainsi que la migration cellulaire. [114]

Le remodelage vasculaire survient naturellement au cours du vieillissement, il est toutefois accéléré par divers événements, telles une pression sanguine élevée, une inflammation vasculaire, l'hyperglycémie et l'hypercholestérolémie. [115-117] Mulvany *et al.* ont défini six catégories pour caractériser ce phénomène, selon que le rayon de la lumière du vaisseau soit réduit ou augmenter et que la paroi artérielle soit inchangée, amincie ou épaissie. (Figure. 5) Le remodelage est dit interne lorsque la



**Figure. 5 : Classification du remodelage vasculaire**

Au cours du remodelage eutrophique, le rapport média/rayon est modifié sans changement de la densité des composantes de la paroi vasculaire. Or, la quantité de matière est augmentée au cours du remodelage hypertrophique et diminuée au cours du remodelage hypotrophique. Lorsque la lumière est réduite, il s'agit de remodelage interne et lorsque la lumière est augmentée, de remodelage externe. *Laurent S, et al., (1997) Médecine sciences 13: 809-819.*

lumière du vaisseau est réduite et externe lorsqu'elle est augmentée. Le terme eutrophique est employé lorsqu'il y a réorganisation des tissus formant la paroi vasculaire autour de la lumière résultant en un amincissement ou en un épaissement de la paroi sans changement au niveau de la densité de ses composantes tandis que les termes de remodelage hypertrophique et hypotrophique s'appliquent respectivement lorsque la densité de matière dans la paroi est augmentée ou diminuée. [118] Il y a également le remodelage compensatoire qui correspond à un remodelage hypertrophique de type externe sans changement au niveau du rayon de la lumière du vaisseau. [119]

Le type de remodelage vasculaire dépend de la nature de l'artère affectée ainsi que des facteurs à l'origine de cette modification. Bien qu'il soit adaptatif à court terme tel que pour l'hypertension, le remodelage vasculaire est généralement pathologique à long terme et peut engendrer des maladies cardiovasculaires, parmi lesquelles l'athérosclérose.

#### 2.2.3.3.1 *L'hypertension*

La pression artérielle se définit par la force exercée par le sang sur la paroi des artères. Elle est exprimée par deux mesures : la pression maximale au moment de la contraction du cœur, soit la systole, et la pression minimale au moment de la relaxation du muscle cardiaque, soit la diastole. La pression artérielle est régulée par le SRAA, le débit cardiaque, le système nerveux autonome et plusieurs autres événements tel que discuté dans la revue de Oparil S. *et al.* [120] Cependant, lorsque ces mécanismes homéostatiques sont déséquilibrés la pression sanguine peut se voir augmentée. Cette élévation de pression en conjonction à des facteurs environnementaux, tels le tabagisme, l'obésité et le stress peut résulter au développement de l'hypertension essentielle. Cette dernière, lorsque non traitée conduit inévitablement, après plusieurs années, au remodelage des vaisseaux quel que soit le territoire artériel. [120] Le type de remodelage rencontré au cours de l'hypertension essentielle est déterminé par le calibre des artères.

La microcirculation est formée par des vaisseaux de diamètre inférieur à 150-300 micromètres, telles les petites artères et les artérioles. Celles-ci régulent la

résistance périphérique via leur tonus myogène intrinsèque, c'est-à-dire via leur faculté à diminuer leur diamètre en réponse à une augmentation de pression par la contraction de leurs CMLV. [121] À court terme, ce phénomène est essentiel puisqu'il assure la perfusion de sang oxygéné à un débit et à une pression constante aux organes cibles en aval. Il évite également une augmentation de pression excessive au niveau des capillaires qui peut être à l'origine d'œdème. [122] En revanche, à plus long terme, la vasoconstriction des CMLV engendre une altération structurale par un processus de remodelage de type eutrophique interne qui résulte en la diminution de la taille de la lumière du vaisseau et à l'épaississement de la paroi vasculaire. [121] Ce remodelage ne fait pas intervenir l'hypertrophie ni l'hyperplasie des CMLV, mais plutôt leur réorganisation à proximité de la lumière du vaisseau. [123] Ce remaniement peut être causé par l'établissement d'un équilibre entre l'apoptose et la prolifération des CMLV situées en périphérie de la paroi et à l'interface de la lumière respectivement ainsi que de la migration des CMLV de la face externe à la face interne du vaisseau. [124] Il y a également, au cours de ce remodelage, une composante inflammatoire qui amplifie ce phénomène ainsi qu'un réarrangement de la matrice extracellulaire qui participe au développement de la rigidité des artères. [125] Le remodelage vasculaire des petites artères et des artéioles est à l'origine de l'accroissement de la résistance périphérique, soit une manifestation distinctive de l'hypertension essentielle. En plus du maintien du tonus myogénique occasionné par l'augmentation de la pression artérielle à long terme, d'autres facteurs sont à l'origine du remodelage des vaisseaux de la microcirculation, dont le SRAA. En effet, l'Ang II participe au maintien de la vasoconstriction chronique des CMLV, directement via l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ou indirectement via la production de ROS par les cellules endothéliales et les CMLV, ce qui diminue la biodisponibilité de NO. De plus, elle influence la migration des CMLV ainsi que les processus fibrotiques et inflammatoires. [126]

La macrocirculation est formée des artères élastiques et des artères musculaires. Au cours de l'hypertension essentielle, l'augmentation de la pression artérielle au sein de ces vaisseaux induit un étirement de la paroi vasculaire et donc l'élongation des cellules endothéliales, des CMLV et des fibroblastes. Cette contrainte

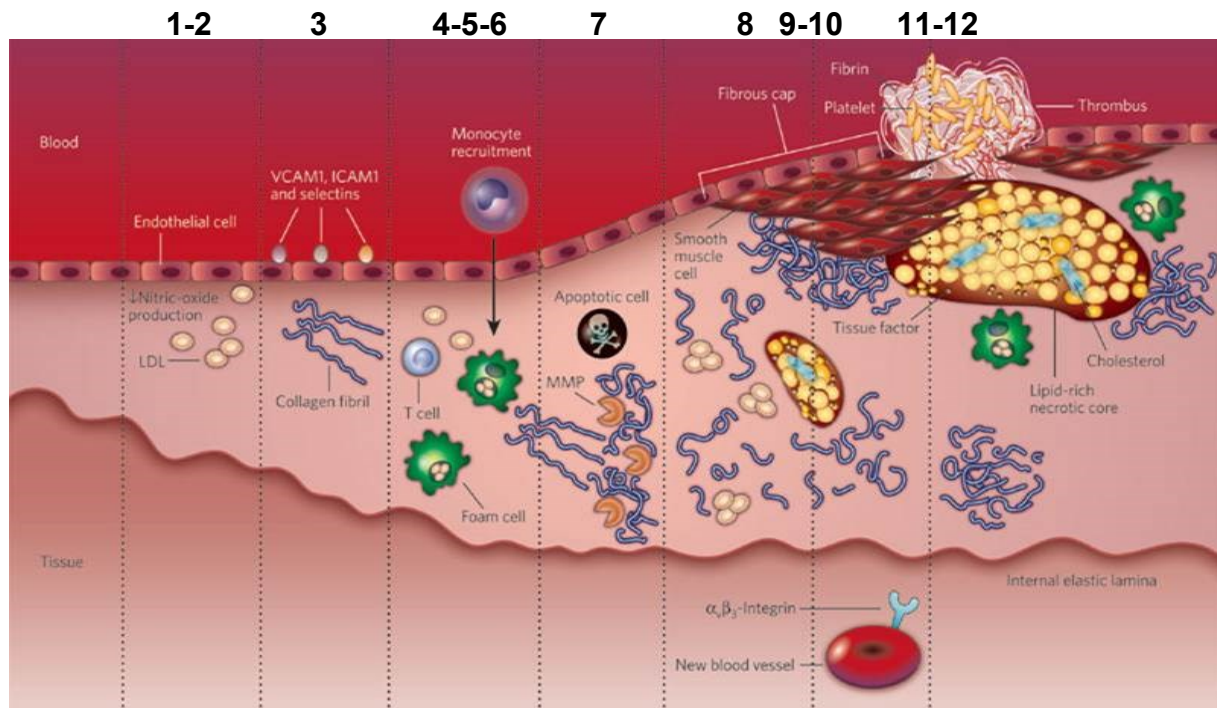
mécanique, lorsque soutenue, est un stimulus pour ces cellules. En effet, en réponse à leur allongement, les cellules endothéliales prolifèrent, sont plus sensibles aux facteurs de croissance et sont à l'origine d'une réponse inflammatoire qui augmente notamment la perméabilité vasculaire. L'élongation prolongée des CMLV y induit des voies de signalisation apoptotiques, hypertrophiques et hyperplasiques. De plus, en conjonction, avec les fibroblastes, elles participent à la réorganisation de la matrice extracellulaire. L'extension de la paroi vasculaire cause également la formation de ROS par toutes les cellules la composant, ce qui contribue à la dysfonction endothéliale. [127] Ces événements sont à l'origine du remodelage de type hypertrophique externe des artères de gros calibres. Le remodelage des artères élastiques se caractérise par une augmentation du diamètre de leur lumière et l'épaississement de leur paroi tandis que celui des artères musculaires est défini par un épaississement de la paroi sans changement au niveau du diamètre de leur lumière. L'élargissement du diamètre des artères élastiques est lié aux dommages du tissu de soutien tandis que l'hypertrophie pariétale des artères de gros calibre est un mécanisme adaptatif visant à normaliser la contrainte circonférentielle. Or, à long terme, ce remodelage cause notamment l'augmentation de la rigidité des gros troncs artériels, ce qui contribue à l'augmentation de la pression pulsée qui correspond à une augmentation de la pression systolique simultanément à une baisse de la pression diastolique. Cette hyperpulsatilité est impliquée dans le remodelage des petites artères et des artérioles. [128]

Le remodelage au niveau de la macrocirculation et de la microcirculation constitue donc un cycle vicieux. En effet, le remodelage des petites artères de résistance et des artérioles en réponse à l'hypertension essentielle contribue à l'augmentation de la résistance périphérique, et donc à l'augmentation de la pression artérielle. Celle-ci est un facteur induisant le remodelage des grosses artères dont l'une des résultantes est une augmentation de leur rigidité et donc de l'augmentation de la pression pulsée. L'ensemble de ces événements induit progressivement des dommages aux organes cibles, soit le cœur, le rein, le cerveau ainsi que l'oeil et potentialise le développement de l'athérosclérose qui peut être favorisé par d'autres facteurs dont le SRAA. [129]

#### 2.2.3.3.2 *L'athérosclérose*

L'athérosclérose se classe au premier rang des causes de mortalité naturelle en Amérique puisqu'elle est l'un des principaux précurseurs d'autres maladies cardiovasculaires comme les infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et les AVC. [130] La compréhension des phénomènes moléculaires à l'origine du développement de cette pathologie est primordiale à l'avancement thérapeutique au niveau de sa prévention, de la diminution de sa progression et de sa régression. Le développement de l'athérosclérose est un phénomène complexe faisant intervenir plusieurs composantes, dont le SRAA intrinsèque aux artères. Cette pathologie est associée à la diminution de la souplesse et de l'élasticité de ces dernières. L'athérosclérose débute précocement, dès l'enfance voire dès la vie intra-utérine. La maladie évolue lentement et plusieurs facteurs de risque, dont l'hypertension, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'obésité abdominale et certaines cytokines accélèrent son développement. L'association de plusieurs de ces facteurs potentialise de manière synergique le développement de la pathologie. Le point commun de ces déterminants pathologiques est leur capacité à induire une dysfonction endothéliale en augmentant, entre autres, l'activité du SRAA intravasculaire. [131-135] Les principaux changements moléculaires associés à la dysfonction endothéliale sont la diminution de la biodisponibilité de NO et une production accrue de ROS. De plus, l'altération de l'endothélium augmente la perméabilité vasculaire et induit l'activation des cellules endothéliales qui contribue à leur état inflammatoire, prolifératif ainsi que procoagulant. [136,137] Certaines régions de l'aorte sont plus susceptibles à subir une dysfonction endothéliale. Les principales sont situées au niveau des coudes et des ramifications de l'arbre artériel puisqu'elles subissent un stress hémodynamique. [138] Les probabilités que l'endothélium y soit physiquement endommagé sont donc plus élevées. Un second événement précurseur au développement de l'athérosclérose est une accumulation élevée de lipoprotéines (LDL) au niveau de l'intima des artères. En effet, leur faible densité et l'augmentation de la perméabilité vasculaire favorisent la diffusion des LDL du plasma à l'intima où ils demeurent séquestrés par leur liaison aux protéoglycans sécrétés par les cellules endothéliales. (Figure. 6) Or, le phénomène crucial pour

l'initiation du développement de l'athérosclérose est l'oxydation des LDL. Cette dernière est occasionnée par l'augmentation de ROS au niveau de l'intima dont l'origine est la dysfonction endothéliale et/ou leur libération par les CMLV ainsi que les cellules endothéliales en réponse notamment à l'Ang II. Les LDL oxydées (oxy-LDL) induisent l'expression de molécules d'adhésion pour les monocytes circulants, dont les protéines vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) et intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) au niveau des cellules endothéliales préalablement activées ou non par la dysfonction endothéliale. Le recrutement des monocytes à l'endothélium est favorisé par la chimiokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) libérée par les cellules endothéliales en réponse à la dysfonction endothéliale et aux oxy-LDL. [139] Les monocytes sont donc recrutés au site de la lésion vasculaire où ils adhèrent à l'endothélium afin de migrer au travers de cette monocouche par un phénomène de diapédèse. (Figure. 6) Ceci résulte en leur accumulation au niveau de l'intima où ils se différencient en macrophages, suite à leur activation par la protéine macrophage colony-stimulating factor qui est aussi relarguée par les cellules endothéliales en réponse à leur dysfonction et aux oxy-LDL. Cet effecteur induit l'expression à la surface des macrophages du récepteur scavenger receptor A et du récepteur CD36, soit deux récepteurs à l'origine de la phagocytose des oxy-LDL. Ainsi, les macrophages deviennent des cellules spumeuses lorsque la concentration en oxy-LDL au niveau de leur cytoplasme est excessive. À ce stade, les stries lipidiques typiques de l'athérosclérose se manifestent et l'apport en monocytes s'accroît au niveau de l'intima, puisque les macrophages et les cellules spumeuses présentes à la lésion vasculaire y sécrètent des cytokines ainsi que des chimiokines qui stimulent leur recrutement et qui activent de surcroît les cellules endothéliales. [139] Également, les cellules spumeuses sécrètent des cytokines à l'origine de la migration d'un nombre important de CMLV de la média à l'intima ainsi que des facteurs de croissance, dont l'Ang II qui en se liant aux macrophages et aux CMLV induit leur croissance. En conjonction à d'autres effecteurs, l'Ang II active également des voies de signalisation menant à la synthèse et à la libération de molécules inflammatoires au niveau de ces deux types cellulaires. Ces molécules



**Figure. 6 : Développement de l'athérosclérose.**

1. Accumulation de LDL au niveau de l'intima. 2. Oxydation des LDL. 3. Les oxy-LDL stimulent l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 par les cellules endothéliales. 4. Recrutement et migration des monocytes au niveau de l'intima. 5. Différentiation des monocytes en macrophages. 6. Phagocytose des LDL et oxy-LDL par les macrophages, elles deviennent alors des cellules spumeuses. 7. Les cellules spumeuses sécrètent des cytokines et des chimiokines. 8. Migration des CMLV de la média à l'intima. 9. Synthèse et libération de molécules inflammatoires et hypertrophiques par les cellules présentes à la lésion. 10. Recrutement et prolifération des lymphocytes T, dépôt incontrôlé de collagène et exacerbation des réponses inflammatoires et hypertrophiques. 11. Formation de la plaque d'athérome. 12. Diminution du diamètre de l'artère ou rupture de la plaque. *Sanz J, Fayad ZA (2008) Nature 451: 953-957.*



augmentent le recrutement monocytaire, stimulent le recrutement et la prolifération des lymphocytes T, amplifient la migration et la croissance des CMLV, contribuent à la recrudescence de la prolifération des macrophages et permettent le maintien de l'activation des voies de signalisation inflammatoires ainsi que la continuité de la libération de divers facteurs de croissance par toutes les cellules présentes à la lésion vasculaire. Ainsi, les événements moléculaires participant au développement de l'athérosclérose, suite à l'oxydation des LDL au niveau de la lésion vasculaire, sont persistants et exacerbés au cours de l'évolution de la pathologie. La liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 contribue à cette amplification des réponses inflammatoires, prolifératives et hypertrophiques incontrôlées. [140]

De plus, l'Ang II et d'autres substances libérées localement induisent un dépôt excessif de matrice extracellulaire au niveau de l'intima suite à leur liaison aux fibroblastes et aux CMLV. Ceci occasionne une plus grande capacité de rétention et d'agrégation des oxy-LDL dans l'intima, ce qui y cause un accroissement de l'inflammation. À ce stade, l'athérosclérose atteint un point critique, soit la formation d'une plaque d'athérome composée d'un cœur lipidique formé de cellules spumeuses et de gouttelettes lipidiques extracellulaires. (Figure. 6) Ce cœur lipidique est bordé par d'autres types cellulaires, tels les macrophages et les lymphocytes T. Le cœur lipidique et les cellules en sa périphérie sont entourés d'une cape fibreuse composée de CMLV et d'une matrice extracellulaire riche en collagène. Celle-ci est formée dans le but de protéger l'athérome de la rupture et d'éviter ainsi le contact entre le sang et les éléments intraartériels. Il y a deux types de plaque athéromateuse, soit les plaques stables, composées d'une riche cape fibreuse, et les plaques vulnérables, dont la cape fibreuse est mince. Bien que leur cape fibreuse soit robuste, les plaques stables ont des effets adverses. En effet, elles diminuent le diamètre des vaisseaux, ce qui a pour répercussion une circulation déficiente du sang qui est à l'origine d'une augmentation de la pression artérielle. Aussi, l'athérome peut complètement bloquer la circulation sanguine en son aval, ce qui peut occasionner des infarctus. Les plaques vulnérables, quant à elles, sont fortement enclines à la rupture. L'évolution d'une plaque stable en plaque vulnérable dépend de l'amincissement de sa cape fibreuse. Cet événement est progressif et débute par une dégradation partielle du

collagène qui dépend de l'activité enzymatique de diverses molécules, dont les métalloprotéinases (MMP) libérées notamment par les CMLV en réponse à l'Ang II. Les cellules formant la plaque libèrent également des protéines pro-apoptotiques qui induisent, entre autres, la mort programmée des CMLV. Ainsi, il y a une diminution graduelle des deux composantes formant la cape fibreuse. La présence d'un nombre croissant de cellules apoptotiques cause la transformation du cœur lipidique en cœur nécrotique. Ce changement est dû à l'incapacité des macrophages à phagocyter les cellules apoptotiques, un processus nommé efferocytose. Les cellules en cours de mort programmée ne sont donc pas éliminées avant la désintégration de leur membrane plasmique, ce qui occasionne l'infiltration dans le tissu environnant de leurs composantes intracellulaires, dont les enzymes, les ROS, les protéases et les protéines pro-apoptotiques. [141] De ce fait, le phénomène de nécrose est l'événement crucial à la vulnérabilité de la plaque puisqu'il induit une augmentation substantielle des protéines impliquées dans la dégradation du collagène ainsi que des protéines impliquées dans l'apoptose. À ce stade, la cape fibreuse est si mince que le simple flux sanguin peut induire sa rupture. Suite à cette scission, plusieurs événements conduisent à la formation d'un thrombus à l'origine d'infarctus et d'AVC. [142] L'Ang II, en parallèle à d'autres éléments, participe à la formation du thrombus en induisant la libération de facteurs de coagulation par les cellules endothéliales et les monocytes.

Le remodelage vasculaire caractéristique de l'athérosclérose est défini par le phénomène de Glagov, soit un remodelage compensatoire qui à long terme se transforme en remodelage de type hypertrophique interne nommé sténose. [143] Cette manifestation est occasionnée par la présence croissante de diverses cellules, cytokines, chimiokines, protéines pro-inflammatoires et facteurs de croissance au niveau de la lésion vasculaire, dont l'Ang II. Cette dernière fut identifiée en premier lieu en tant qu'hormone, mais ses effets notamment au niveau du remodelage vasculaire l'ont redéfinie en tant que protéine pro-inflammatoire et en tant que facteur de croissance.

#### *2.2.3.3.2.1 Accent sur les CMLV*

La migration des CMLV de la média vers l'intima de la paroi artérielle, ainsi que leur hypertrophie et leur prolifération, constituent des étapes clés dans le développement de l'athérosclérose. En condition physiologique, les CMLV sont présentes majoritairement à la média où elles sont quiescentes ou de phénotype contractile. Par contre, l'analyse des CMLV retrouvées au niveau de l'intima des plaques athéromateuses a démontré que ces cellules ont acquis la capacité de migrer, de proliférer et de sécréter des composantes de la matrice extracellulaire ainsi que des molécules clivant cette dernière. Ces cellules représentent des cellules contractiles dédifférenciées en cellules de phénotype synthétique. [144] Cette dédifférenciation est observée lors d'événements causant des lésions vasculaires afin d'assurer le rétablissement de ces dernières. Elle implique la production et la libération par les cellules endothéliales et les macrophages d'un certain nombre de facteurs de croissance, dont le facteur de croissance épidermique, le facteur de croissance dérivé des plaquettes, le facteur de croissance endothélial vasculaire et l'Ang II. La réparation du vaisseau se conclue par la redédifférenciation des CMLV en un phénotype contractile. Dans le cas contraire, un remodelage vasculaire pathogénique s'opère ce qui génère des lésions vasculaires irréversibles au niveau de l'intima, telle l'athérosclérose. L'incapacité des CMLV à retrouver un phénotype contractile est occasionnée par une présence excessive de mitogènes et de facteurs de croissance dans le microenvironnement cellulaire.

La dédifférenciation des CMLV dans la média est la prémisse à leur migration au niveau de l'intima, s'ensuivent leur prolifération, leur inflammation et leur hypertrophie. [144] Tous ces événements peuvent être à l'origine du développement de différentes maladies cardiovasculaires et sont sous la gouverne de plusieurs effecteurs, dont l'Ang II. Cette dernière participe au phénomène migratoire suite à l'activation de cascades de signalisation menant à l'activation des protéines Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38) et v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT) tandis qu'elle régule leur état inflammatoire ainsi qu'hypertrophique principalement par l'activation des protéines nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) et mammalian target of rapamycin (mTOR) respectivement. [145] Malgré ces connaissances, les protéines couplant le récepteur AT1 à ces derniers

effecteurs sont peu caractérisées. La démystification des processus moléculaires intrinsèques aux voies de signalisation engendrées par l'Ang II sont donc sous investigation puisque certaines protéines activées par cet octapeptide représentent possiblement des cibles thérapeutiques potentielles puisqu'elles sont assurément régulées par des modifications post-traductionnelles et/ou sont à l'origine de telles modifications. En effet, ces dernières peuvent être aisément activées ou inhibées par des composés chimiques puisqu'elles sont régies par des protéines possédant une activité enzymatique.

### **3.0 Les modifications post-traductionnelles**

De nombreuses modifications chimiques se produisent suite à la polymérisation des acides aminés par le ribosome, c'est-à-dire suivant la traduction des protéines. Ces modifications sont donc dites post-traductionnelles et entraînent un changement de fonction au niveau de la protéine, que ce soit à l'échelle de son action, de sa demi-vie, ou de sa localisation. Les principales catégories de modifications post-traductionnelles sont l'ajout d'un groupement fonctionnel et l'addition de groupes peptidiques ou de protéines entières sur des acides aminés spécifiques formant la protéine cible. Il y a plus d'une vingtaine de modifications chimiques associées à l'ajout d'un groupement fonctionnel, telle la glycosylation qui induit notamment la sécrétion de diverses protéines ; l'acétylation qui, au niveau des histones, favorisent la transcription ; la prénylation qui permet la fixation d'une protéine à la face interne de la membrane plasmique ; et la phosphorylation, qui consiste à l'addition d'un groupe phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. En contrepartie, le nombre de modifications associées à l'ajout de groupes peptidiques ou de protéines est plus restreint. Les plus fréquentes sont l'ubiquitination, impliquée entre autres dans la dégradation des protéines, et la sumoylation, impliquée notamment dans les transports nucléo-cytoplasmique et la progression du cycle cellulaire. [146]

Bien qu'une modification post-traductionnelle soit associée à une fonction précise, la régulation d'une protéine dépend généralement d'un amalgame de ces dernières.

L'interconnexion la plus souvent rencontrée fait intervenir la phosphorylation et l'ubiquitination. [146]

### **3.1 La phosphorylation et l'ubiquitination**

Les compréhensions moléculaires des mécanismes qui régissent les modifications post-traductionnelles et la détermination de leurs conséquences sur leurs protéines cibles sont importantes puisqu'elles gouvernent, en partie, le devenir des voies de signalisation qui sont essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire et dont la dérégulation est intimement associée à diverses pathologies. Il y a des molécules aptes à inhiber ou induire ces modifications et certains de ces composés sont de nos jours prescrits chez des patients atteints du cancer. [147] Ainsi, la modulation des modifications post-traductionnelles engendrées par la liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 représente une cible thérapeutique potentielle en ce qui a trait à l'athérosclérose.

#### **3.1.1 La phosphorylation**

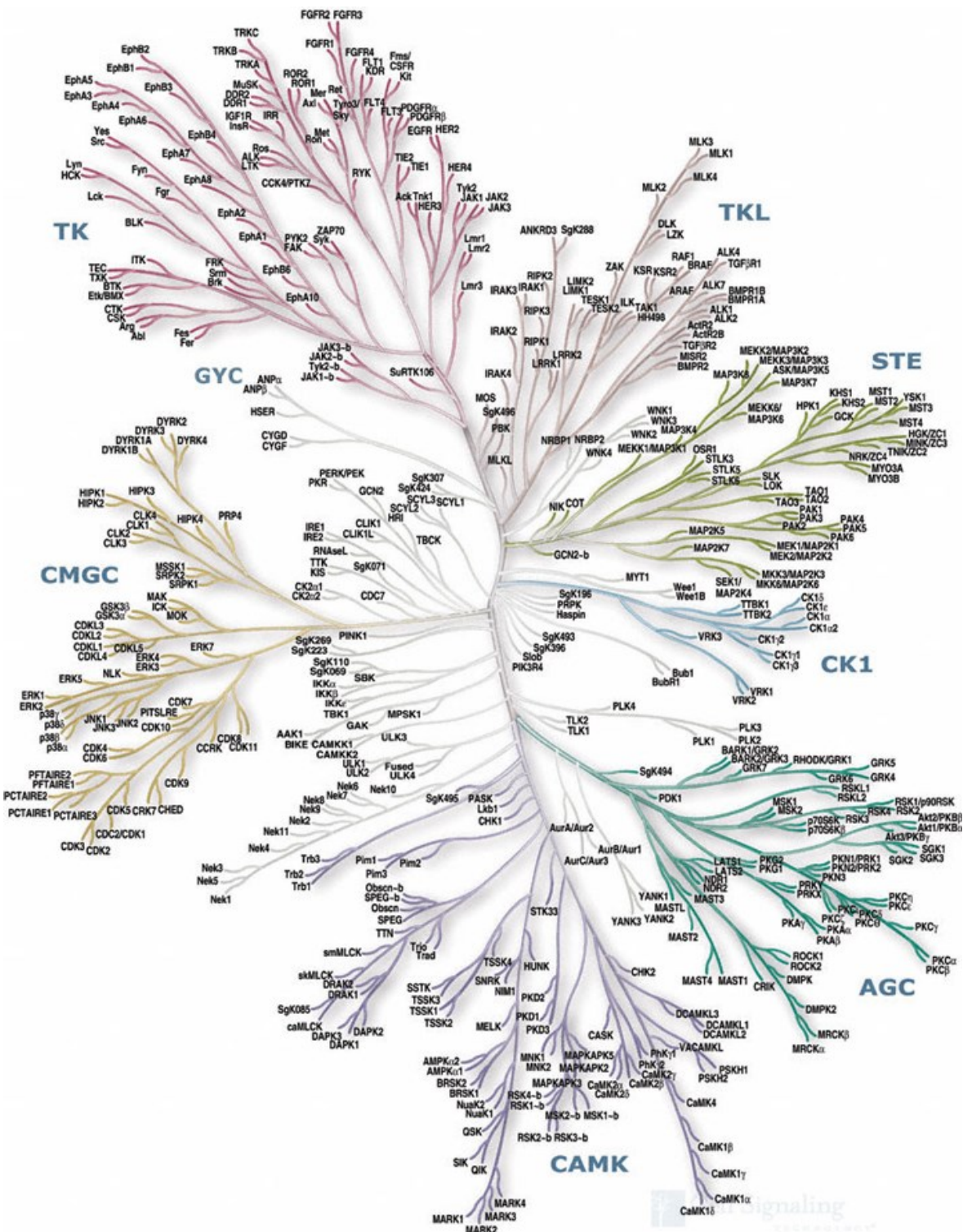
Les protéines kinases, dites kinases, sont les enzymes à l'origine de la modification post-traductionnelle nommée phosphorylation qui fut découverte au début des années 1950. Les kinases catalysent le transfert d'un groupe phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) aux acides aminés de la protéine cible possédant un groupement hydroxyle, soit les résidus sérine, thréonine et tyrosine. Il y a trois types de kinases : les sérine/thréonine-kinases, les tyrosine-kinases et les kinases ayant la capacité de phosphoryler les trois résidus. Le taux de phosphorylation de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine est respectivement de 1000/100/1. Cependant, bien que la phosphorylation du résidu tyrosine soit quantitativement mille fois moins fréquente que la phosphorylation du résidu sérine, son incidence biologique est tout aussi importante. [148]

##### **3.1.1.1 Le kinome**

Les kinases régulent de nombreux processus, telles la différenciation, la division et la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose, en opérant particulièrement au niveau des cascades de signalisation via leur activité phosphotransférase. Il y a

518 gènes codant pour des kinases, ce qui représente 2% du génome ; elles constituent donc l'une des familles les plus nombreuses et les plus diversifiées du protéome. Les kinases forment à elles seules un sous-type de ce dernier, soit le kinome. De plus, plus de 30% de toutes les protéines constituant la cellule sont sujettes à la phosphorylation ainsi cette modification régit plus du tiers du devenir du protéome. Parmi le kinome, 478 protéines possèdent une séquence analogue en acides aminés au niveau de leur domaine catalytique formant ainsi une superfamille. Cette superfamille est subdivisée en sept groupes phylogéniques qui sont divisés en sous-groupes qui sont eux-mêmes fractionnés en d'autres ensembles, formant au final un dendrogramme où le degré d'homologie de la séquence en acides aminés des protéines le composant s'accroît de segmentation en segmentation. (Figure. 7) Les quarante autres protéines ont un domaine catalytique dit atypique, mais il a été démontré qu'elles possèdent tout de même une activité phosphotransférase.

La superfamille de protéines kinases est composée de sept familles distinctes. Il y a la famille caséine-kinase 1 qui fut la première à être décrite en 1975. Elle est composée de protéines sérine/thréonine-kinases dont la fonction majeure est la régulation des voies de signalisation essentielles au développement foetal. [149] La deuxième, décrite en 1981, est la famille des protéines kinases calcium/calmoduline-dépendantes formée de protéines sérine/thréonine-kinases. Leur liaison à la calmoduline induit leur activation, par contre la calmoduline se doit d'être préalablement activée par le calcium pour être en mesure de lier les kinases. Ces dernières sont impliquées au niveau de la régulation de la contraction musculaire, de la sécrétion de neurotransmetteurs et du métabolisme du glycogène. [150] À la fin des années 1980, la famille CMGC-kinase a été identifiée et inclut notamment les MAPK qui sont des protéines sérine/thréonine-kinases. Ces dernières ainsi que les protéines kinases régulant leur activité furent et sont toujours les protéines les plus étudiées, puisque la dérégulation de leur activité fut en premier lieu associée au développement de tumeurs cancéreuses malignes. Ceci étant, malgré leur incidence pathologique, elles régissent tout de même des fonctions physiologiques clé au devenir de la cellule puisqu'elles participent à des voies de signalisation impliquées



**Figure. 7 : Le kinome.**

CAMK : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase; AGC: Containing PKA, PKG, PKC families; CK1: Casein kinase 1; STE: Homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases; TKL: Tyrosine kinase-like; TK: Tyrosine kinase; CMGC : Containing CDK, MAPK, GSK3, CLK families.

dans l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. À ce jour, six MAPK ont été caractérisées, soit les protéines extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 et p38  $\alpha/\beta/\gamma$ /ERK6/ $\delta$  [151,152] Les protéines kinases modulant l'activité des MAPK, font partie d'une autre famille, la famille STE. Elles se nomment les MAP kinases kinases (MAPKK) qui sont elles-mêmes activées par des MAP kinases kinases kinases (MAPKKK). Une caractéristique unique des MAPKK est leur double spécificité, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de phosphoryler les résidus sérines/thréonines et tyrosines, telle la MAPKK mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK)1/2 qui active ERK1/2. [153] En 1995, la famille AGC-kinase fut découverte par Steven Hanks et Tony Hunter. Elle fut nommée ainsi puisque ses protéines ont une identité de séquence avec les kinases PKA, PKC et GMPc-dépendante. Cette famille est composée de soixante protéines sérine/thréonine-kinases, dont l'une des plus étudiées est AKT. Les protéines AGC-kinases sont particulièrement impliquées dans le processus métabolique, la prolifération et la migration cellulaire. [154] Il y a aussi les familles tyrosine kinase et tyrosine kinase-like. La première est constituée de plus de 90 protéines qui ont une activité phosphotransférase envers le résidu tyrosine. Les tyrosine-kinases sont divisées en deux classes, soit les récepteurs tyrosine-kinases et les tyrosine-kinases cytosoliques. Le récepteur de l'insuline fait partie de la première catégorie tandis qu'un important proto-oncogène, soit la protéine v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (SRC) fait partie de la seconde. Les tyrosine-kinases autant membranaires que cytosoliques régulent divers processus cellulaires, dont la croissance, la différenciation et la survie cellulaire ainsi que l'apoptose. L'importance des compréhensions moléculaires concernant cette famille repose sur le fait qu'une phosphorylation déficiente ou excessive au niveau des résidus tyrosine est l'un des facteurs principaux à la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. La famille tyrosine kinase-like tire son patronyme du fait que l'homologie de la séquence du domaine catalytique ainsi que les caractéristiques structurales des kinases la composant sont analogues à la famille des tyrosine-kinases, mais que leur activité cible les résidus sérines/thréonines. La MAPKKK qui active MEK1/2 fait partie de cette famille, soit la protéine rapidly accelerated fibrosarcoma. [155] Finalement, il



Il y a des protéines au niveau de la superfamille qui sont orphelines de famille puisque leur congruence avec les sept autres familles est trop faible. Il s'agit du groupe des autres kinases. Le complexe I $\kappa$ B kinase (IKK), un important effecteur pro-inflammatoire, fait partie de cette dernière famille et son activité phosphotransférase cible les résidus sérines et thréonines. [148] Ainsi, le kinome est graphiquement explicite en se présentant sous la forme d'un dendrogramme. Cependant, la compréhension des fonctions des protéines le composant ainsi que la démystification de la biologie moléculaire entourant les voies de signalisation auxquelles les kinases participent s'avèrent beaucoup plus complexes.

Le kinome est tout de même un outil efficace pour l'identification de la fonction des protéines le composant et la détermination de leur apport dans le développement de diverses maladies puisque les kinases appartenant à une même famille partagent des fonctions similaires. En effet, certaines familles sont conservées au niveau du kinome de la levure, de la drosophile, du ver et de l'humain. Ainsi, les fonctions autant physiologiques que pathologiques des kinases humaines peuvent être déduites des kinomes des organismes modèles. En ce qui concerne les kinases humaines qui ne sont pas conservées de modèle en modèle, leur rôle peut tout de même être estimé via leur classification au niveau du kinome suite à une analyse comparative des séquences de ces protéines aux protéines déjà cartographiées. Les études liées au kinome ont permis d'associer environ 160 kinases à des maladies humaines ce qui est non négligeable, cependant le nombre de kinase participant au développement de pathologies est hautement plus élevé. [148] Ainsi, en addition au kinome, les études *in vitro* et *in vivo* entourant ce type de protéines sont d'actualité. De plus, leurs inhibiteurs représentent la plus importante classe d'agents thérapeutiques au niveau des essais cliniques. Parmi ceux-ci, le Gleevec est prescrit pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique, car il est un inhibiteur compétitif de l'activité tyrosine-kinase de la protéine chimérique BCR-ABL, dont la suractivation est à l'origine de cette maladie. [147]

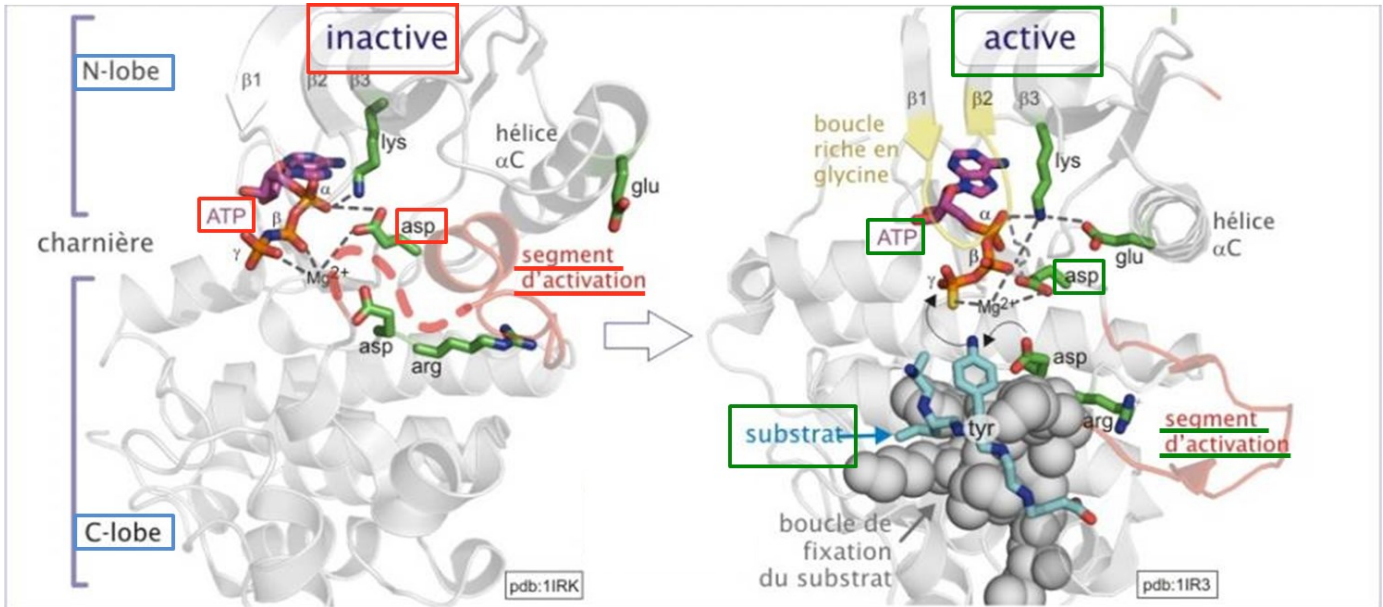
### **3.1.1.2 Domaine catalytique**

La structure tridimensionnelle du domaine catalytique des sérine/thréonine-kinases et des tyrosine-kinases est analogue. Il est formé de deux lobes, soit un en N-terminal et un en C-terminal. À l'interface de ces lobes se situe la fente catalytique. Celle-ci est associée à un segment d'activation et est alignée parallèlement à une boucle fixant l'ATP. Le domaine catalytique comprend également un acide aminé conservé, l'aspartate, qui agit en tant que catalyseur lors de la réaction phosphotransférase. (Figure. 8) Bien que ce domaine soit conservé, il est entouré par des séquences variables en acides aminés qui déterminent à la fois l'affinité pour le substrat, l'interaction avec une sous-unité régulatrice et/ou la localisation cellulaire de la kinase. [156]

L'activation de la kinase dépend notamment de l'accès du substrat à sa fente catalytique. Cet accès peut être obstrué par un pseudo-substrat et cette restriction est supprimée par la présence de seconds messagers. Le segment d'activation peut également bloquer l'accès du substrat à la fente catalytique. Ainsi, de nombreuses kinases doivent être elles-mêmes phosphorylées au niveau de leur segment d'activation afin d'y induire un changement de conformation qui résulte en son retrait de la fente catalytique. [157]

### **3.1.1.3 Spécificité du substrat**

L'analyse des séquences de plusieurs substrats a démontré que leur sélection par les kinases requiert un minimum de quatre acides aminés en amont et en aval du site phospho-accepteur. Cette séquence dite séquence de reconnaissance correspond au site consensus associé à une kinase. Un même site consensus peut se trouver au sein de différents substrats, ainsi une kinase donnée peut phosphoryler différentes protéines. La spécificité du mécanisme de phosphorylation provient plutôt des protéines recrutées au niveau d'un microenvironnement cellulaire formé suite à l'activation d'un récepteur. Cette colocalisation est assurée par des protéines adaptatrices. [158]



**Figure. 8 : Domaine catalytique des kinases.**

Le domaine catalytique des kinases est formé de deux lobes englobant un segment d'activation qui est alignée parallèlement à une boucle fixant l'ATP. De nombreux changements de conformation sont nécessaires au sein du domaine catalytique afin que la kinase passe d'un état inactif à un état actif. En effet, ces derniers permettent au substrat de s'y insérer et permettent un positionnement favorable de l'ATP ainsi que d'un résidu aspartate pour l'induction de son activité phosphotransférase. *Foreman JC, et al. (2011) Textbook of Receptor Pharmacology, Third Edition: Taylor & Francis.*

### 3.1.1.4 Phosphatases

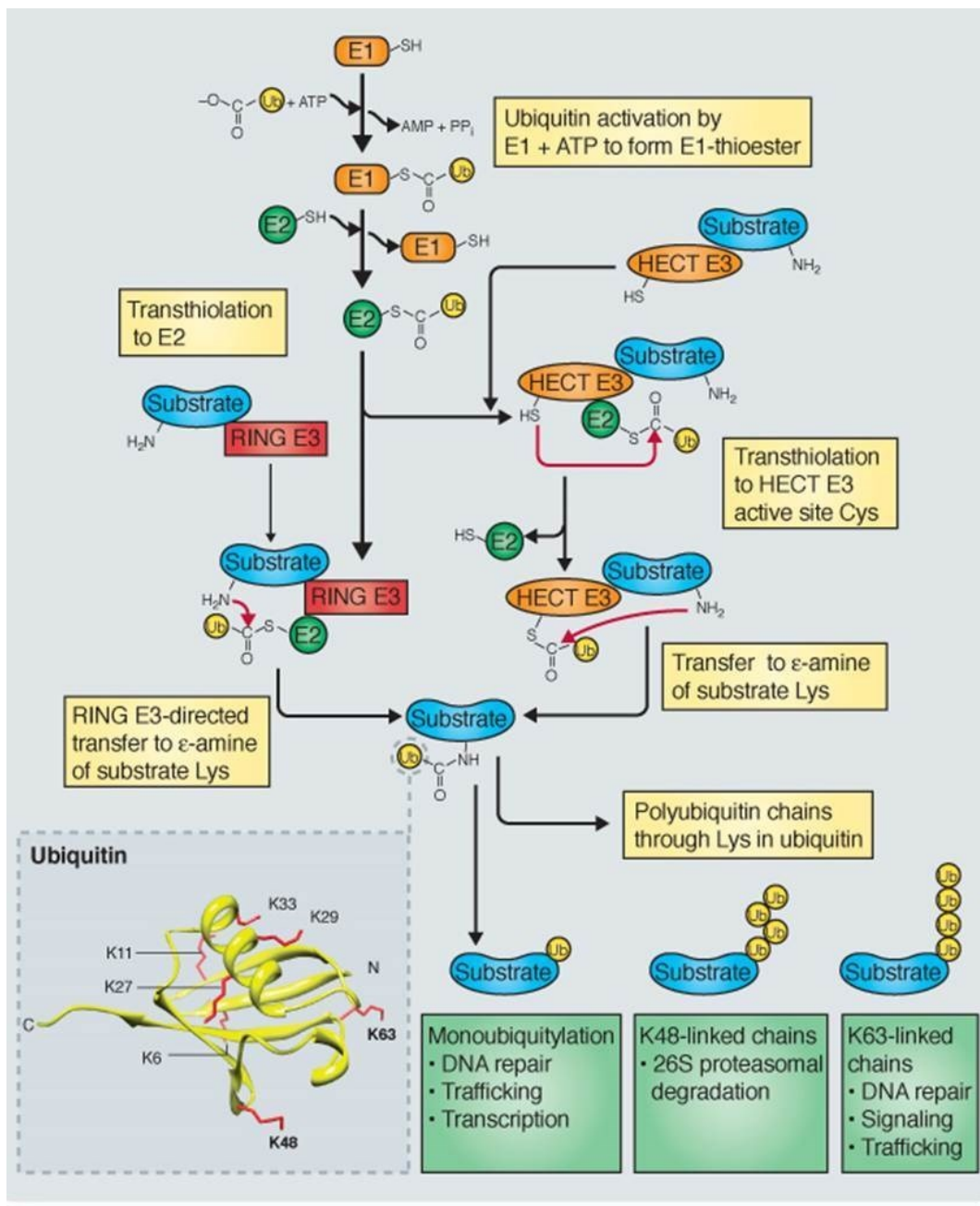
La phosphorylation est une modification post-traductionnelle transitoire puisqu'il existe un équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation. Cette dernière est modulée par les protéines phosphatases qui sont en nombre de 222 au niveau du génome. Contrairement aux kinases, les phosphatases ne sont pas classifiées selon un dendrogramme, mais sont réparties en seulement quatre familles selon l'homologie de leur séquence, de leur structure, de leur fonction catalytique et de leur sensibilité aux inhibiteurs. Il y a trois familles de sérine/thréonine-phosphatases, soit les phospho-protéines phosphatases, les protéines phosphatases

magnésium-dépendantes et les phosphatases à aspartate. La quatrième famille est constituée des tyrosine-phosphatases, telles les MAP kinase phosphatases. Les protéines classifiées dans cette dernière famille sont uniques en leur genre puisqu'elles ont la capacité de déphosphoryler autant les résidus tyrosines, sérines et thréonines. [159] Ainsi, l'amplification des voies de signalisation est régulée, non seulement par le devenir du récepteur à l'origine de son activation, mais également par des modifications post-traductionnelles réversibles.

En plus de la phosphorylation, la régulation d'une protéine peut dépendre de la conjonction de ce dernier mécanisme à d'autres modifications post-traductionnelles ce qui accentue la complexité des voies de signalisation. En effet, les études caractérisant ces dernières, dont celles dépendantes de l'Ang II dans les CMLV, ont démontré que l'activité de certaines kinases est régulée par la phosphorylation et l'ubiquitination.

### **3.1.2 L'ubiquitination**

La modification post-traductionnelle nommée ubiquitination fut identifiée à l'orée des années 1980, soit approximativement 30 ans après la découverte de la phosphorylation. Cependant, depuis sa mise en évidence, il a clairement été démontré que son rôle est aussi primordial que sa consœur dans la régulation des voies de signalisation cellulaire et par conséquent au niveau des fonctions physiologiques de la cellule. L'ubiquitination est généralement définie par l'addition covalente d'une protéine de 76 acides aminés, l'ubiquitine (Ub), au niveau d'un résidu lysine d'une protéine cible. Cette modification post-traductionnelle est plus complexe que la phosphorylation puisqu'elle fait intervenir trois enzymes. (Figure. 9) En premier lieu, l'enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) active l'Ub en fixant le résidu glycine C-terminal de celle-ci sur un résidu cystéine de son site actif par une liaison thioester, un mécanisme dépendant de l'ATP. L'Ub est ensuite transférée sur un résidu cystéine au sein du domaine catalytique de l'enzyme de conjugaison (E2) par transthiolation. Suite à la fixation de l'ubiquitine à la E2, l'enzyme ubiquitine ligase



**Figure. 9: Mécanisme de l'ubiquitination.**

L'ubiquitination des protéines fait intervenir l'action concertée de trois enzymes, soit l'enzyme d'activation E1, l'enzyme de conjugaison E2 et la protéine ligase E3. Il y a deux familles principales de E3 : les HECT et les RING. Les HECT forment un lien covalent avec l'Ub et la transfère par la suite au substrat tandis que les RING agissent en tant qu'intermédiaire en s'associant simultanément à la E2 et au substrat. Elles transfèrent ensuite l'Ub liée à la E2 au substrat. Ub: Ubiquitine ; HECT: Homologous to the E6-AP carboxy terminus; RING: Really interesting new gene; K: Lysine.

*Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM (2012) J Cell Sci 125: 531-537.*

(E3) entre en jeu en liant simultanément la E2 ainsi que la protéine cible. La E3 confère donc la spécificité du substrat en agissant en tant qu'élément de reconnaissance pour ce dernier. Suite à cette cascade enzymatique, la protéine cible est dite mono-ubiquitinée, c'est-à-dire, qu'il y a une liaison amide entre le groupe carboxyl du résidu glycine C-terminal de l'Ub et le groupement amine d'un résidu lysine interne de la protéine. L'ubiquitine peut elle-même devenir un substrat pour l'ubiquitination, car elle contient sept lysines pouvant être ubiquitinées. Ainsi, un second cycle faisant intervenir les trois enzymes peut induire un lien isopeptidique entre la glycine C-terminal d'une nouvelle Ub et une lysine spécifique de l'Ub déjà liée à la protéine cible. Si le cycle enzymatique se répète à maintes reprises, il y a formation d'une chaîne de poly-ubiquitines (poly-Ub) et dépendamment de la ou des lysines participant aux liens ubiquitine-ubiquitine, une fonction spécifique est octroyée à la protéine. [160]

#### **3.1.2.1 L'ubiquitine**

La molécule d'Ub est hautement conservée chez les cellules eucaryotes où elle représente environ 0.1% à 5% du pool protéique total. Dû à l'importance de l'ubiquitination au niveau du devenir de la cellule, cette dernière a acquis différents mécanismes afin d'assurer une formation adéquate de molécules monomériques d'Ub. Ces dernières sont initialement exprimées sous la forme de trois différents précurseurs suite à la transcription de quatre gènes, soit *Uba52*, *Uba80*, *Ubb* et *Ubc*. Les gènes *Uba52* et *Uba80* codent pour une seule Ub qui se trouve fusionnée aux sous-unités ribosomales L40 et S27 respectivement. Les gènes *Ubb* et *Ubc* codent pour plusieurs Ub et induisent ainsi la formation de chaînes de poly-Ub formées respectivement de quatre et neuf molécules d'Ub en tandem. Ces précurseurs sont clivés afin de libérer des molécules d'Ub monomériques identiques. Les Ub sont par la suite prises en charge par l'enzyme E1. [161]

#### **3.1.2.2 L'enzyme d'activation : E1**

La première étape essentielle à la réaction d'ubiquitination est l'activation de l'extrémité C-terminal de l'Ub. Cette réaction est sous la dépendance de la E1 et requière deux étapes. En premier lieu, la E1 lie simultanément une molécule d'ATP et

une molécule d'Ub afin d'induire son adénylation en son extrémité C-terminal. Par la suite, la E1 induit le transfert de l'Ub à l'une de ses propres cystéines ce qui résulte en la formation d'un lien thioester entre la E1 et l'Ub. [162] Suite à la formation de ce lien thioester, il y a transfert de l'Ub de la E1 à l'enzyme E2. Il n'y a que deux E1 identifiées à ce jour, soit Ube1 et Ube6. Ces deux protéines ont une affinité similaire pour l'ubiquitine mais ne partagent qu'une homologie de séquence de 40%, ce qui suggère qu'elles auraient des affinités distinctes pour les diverses E2. [163]

### **3.1.2.3 L'enzyme de conjugaison : E2**

Le génome humain code pour environ une cinquantaine de E2. Leur domaine catalytique, soit leur domaine Ubc, a été conservé au cours de l'évolution comparativement à leur domaine N- et C-terminal. Ces dernières extrémités contribuent à l'activité intrinsèque de la E2 et facilite son interaction avec une E3 ligase donnée. La E2 induit dans un premier temps le transfert de l'Ub de la E1 à un résidu cystéine situé au niveau de son Ubc, via une réaction de trans(thio)estérification. En second lieu, elle transfère l'Ub à une E3 ligase ou directement à une protéine cible. Une même E2 peut induire la mono-ubiquitination ou la poly-ubiquitination de divers type de chaînes, c'est la E3 avec laquelle elle agit qui régit sa fonction précise. [162]

### **3.1.2.4 L'ubiquitine ligase: E3**

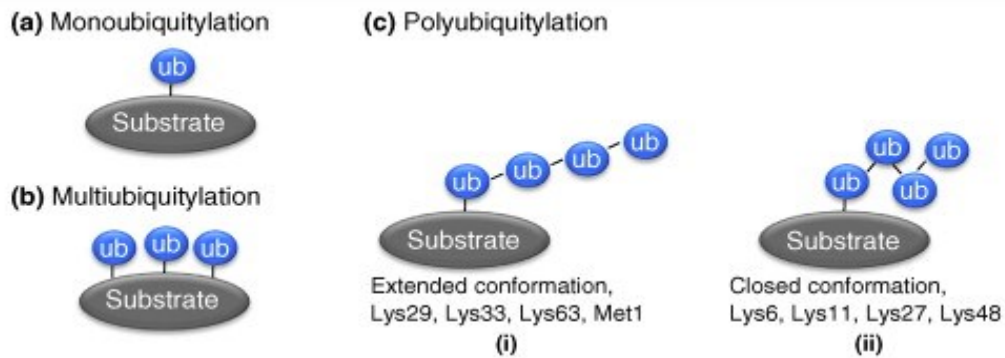
Le génome humain encode deux E1 et une cinquantaine de E2. Par contre, il peut induire la production de plus de 600 E3. La fonction principale de la E3 est la catalyse d'un lien isopeptidique entre la lysine de la protéine cible et la glycine C-terminal de l'Ub qui a préalablement été fixée à la E2. [164] Il existe trois types de E3 ligases, soit les Homologous to the E6-AP carboxy terminus (HECT), les really interesting new gene (RING) ainsi que les U-Box. Les E3 ligases sont classifiées dans l'une ou l'autre de ces familles selon la nature de leur domaine catalytique. Les HECT et les RING sont les types de E3 ligases intervenant majoritairement au niveau des voies de signalisation. Elles fonctionnent selon des mécanismes distincts, les E3 ligases de la famille HECT transfèrent l'Ub de la E2 à l'un de ses propres résidus cystéines pour ainsi former un lien thioester avec l'Ub. (Figure. 8) Cette dernière est par la suite

transférée de cet intermédiaire covalent à la protéine cible. Quant aux E3 ligases de la famille RING, elles induisent le transfert direct de l'Ub fixée à la E2 à la protéine cible, de concert ou non avec des cofacteurs. [165] Une même E3 ligase peut avoir différents substrats, peut induire la mono-ubiquitination et/ou la poly-ubiquitination, et ce, en conjonction avec une E2 donnée. Ainsi, les combinaisons possibles d'une même E2 à plus de 600 E3 et d'une même E3 à environ cinquante E2 complexifient le phénomène d'ubiquitination, ce qui lui confère une importante spécificité et la capacité de moduler diverses réponses cellulaires.

### **3.1.2.5 Fonctions de l'ubiquitination**

Les enzymes E1-E2-E3 induisent l'ubiquitination des protéines afin de réguler leur activité. La mono-ubiquitination d'un seul résidu lysine d'une protéine cible est majoritairement reconnue pour être impliquée au niveau de l'endocytose, du transport intracellulaire et de la réparation de l'ADN. Par contre, certaines protéines peuvent être mono-ubiquitinées au niveau de plusieurs résidus lysines les composant, ce processus créant une protéine dite multi-mono-ubiquitinée. Ce mécanisme de multi-mono-ubiquitination est principalement associé à l'internalisation des récepteurs. (Figure. 10 A-B) [166] Il y a sept résidus lysines au niveau de l'Ub, soit les Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 et Lys63. Les chaînes de poly-Ub sont dites homotypiques lorsque la liaison entre les Ub fait intervenir le même type de résidu lysine tout au long de la chaîne. Les protéines cibles peuvent être modifiées, soit par une seule chaîne homotypique, par plusieurs chaînes homotypiques de mêmes espèces ou par plusieurs chaînes homotypiques de diverses espèces. Dépendamment de la nature des Lys participant à la formation des chaînes, ces dernières adoptent une structure tridimensionnelle (3D) qui leur est unique. (Figure. 10 C) Il y a également deux types de chaînes de poly-Ub dites hétérotypiques, l'une est caractérisée par l'alternance des lysines participant aux liens Ub-Ub et la seconde est caractérisée par l'ubiquitination de plusieurs résidus lysines au niveau d'une même Ub. De plus, il existe des chaînes de poly-Ub qui ne sont pas caractérisées par des liens lysines entre les Ub, mais plutôt par des liens formés entre l'extrémité N-terminal d'une Ub et l'extrémité C-terminal d'une seconde Ub. Ces





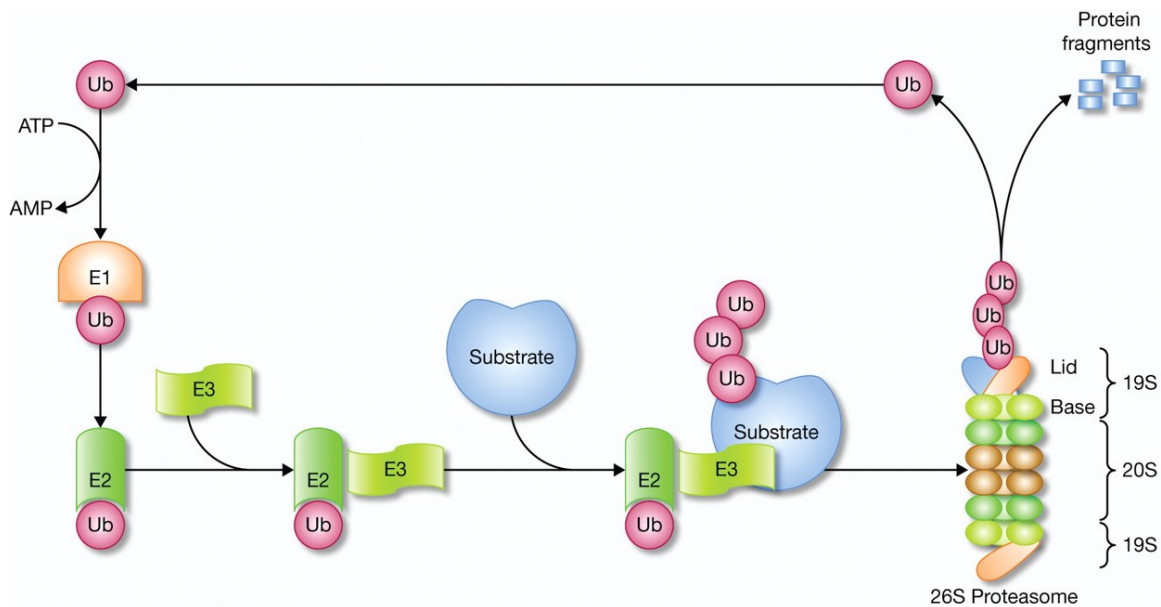
**Figure. 10 : Les différents types d'ubiquitination.**

A) Mono-ubiquitination : ajout d'une molécule d'Ub à un résidu lysine d'un substrat. B) Multi-mono-ubiquitination : ajout d'une molécule d'Ub à différents résidus lysine retrouvé au sein d'un même substrat. C) Poly-ubiquitination: une molécule d'Ub est ajoutée à une lysine d'un substrat, un second cycle faisant intervenir les enzymes E1-E2-E3 induit un lien isopeptidique entre une lysine de cette dernière et la glycine en C-terminal d'une nouvelle Ub. Il y a formation d'une chaîne de poly-Ub lorsque le cycle se répète de nombreuses fois. (i) Les chaînes dont les liens Ub-Ub font intervenir les Lys29, Lys33, Lys63 ou leur extrémité N-terminal adoptent une conformation 3D linéaire. (ii) Les chaînes dont les liens Ub-Ub font intervenir les Lys6, Lys11, Lys27 ou Lys48 adoptent une conformation 3D repliée. ub : ubiquitine ; Lys : lysine. *Komander D (2009) Biochem Soc Trans 37: 937-953.*

dernières adoptent une conformation linéaire et ce nomme chaîne M1. La configuration des chaînes de poly-Ub est ce qui confère une fonction spécifique à une protéine ubiquitinée. [164] La vaste diversité des fonctions cellulaires associées au mécanisme d'ubiquitination est donc due notamment aux innombrables variétés de chaînes de poly-Ub pouvant être synthétisées.

La première fonction attribuée aux chaînes de poly-Ub est leur capacité à réguler la demi-vie des protéines. En effet, au cours des années 1980, il a été démontré que la modification des protéines par des chaînes de poly-Ub en Lys48 conduit à leur dégradation. La purification des protéines marquées par ce type de chaînes a permis d'isoler le complexe multi-protéique à l'origine de leur dégradation, soit le

protéasome. [167,168] (Figure. 11) La découverte de ce système Ub- protéasome eu un impact majeur tant au niveau des compréhensions moléculaires de la cellule qu'au niveau thérapeutique puisqu'elle contribua à l'élaboration d'une molécule pour le traitement du cancer, soit le bortézomib approuvé par la 'Food and Drug Administration' en 2003. [169] L'ubiquitination fut associée à la dégradation protéique de 1980 à 1999, puisque au cours de cette dernière année un groupe de recherche a révolutionné le monde de l'ubiquitination en démontrant l'existence d'un autre type de chaîne n'ayant aucune incidence au niveau de la dégradation protéique, soit les chaînes de poly-Ub en Lys63. (Figure.10 C (i)) Cette étude illustre que ces dernières sont plutôt impliquées au niveau de la transduction du signal en réponse aux



**Figure. 11 : Système ubiquitine-protéasome.**

Un nombre donné de cycles faisant intervenir les enzymes E1-E2-E3 conduit à la formation d'une chaîne de poly-Ub en Lys48 au niveau d'une protéine cible. Lorsque la chaîne est formée d'au minimum quatre molécules d'ubiquitine, la protéine cible est reconnue par le protéasome 26S et conséquemment dégradée. La chaîne de poly-Ub est quant à elle démantelée afin que les molécules d'Ub soient recyclées. E1 : enzyme activatrice de l'ubiquitine ; E2 : enzyme de conjugaison ; E3: Enzyme ubiquitine ligase ; Ub:ubiquitine. *Rahimi N (2012) Mol Cancer Ther 11: 538-548.*

dommages à l'ADN. [170] Depuis la constatation de la présence de telles chaînes au niveau cellulaire, l'existence des cinq autres type de chaînes de poly-Ub a été démontrée. Par exemple, la poly-ubiquitination en Lys11 est impliquée dans la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique et la poly-ubiquitination en Lys29 est impliquée dans la dégradation des protéines cellulaires dépendante des lysosomes. Par contre, les chaînes de poly-Ub les plus étudiées sont celles faisant intervenir la Lys63, car ce sont majoritairement ces dernières qui sont impliquées dans la régulation de nombreuses voies de signalisation en réponse à des stimuli spécifiques et ainsi responsables, en partie, de plusieurs réponses biologiques de nature physiologiques ou pathologiques. [164]

#### **3.1.2.6 Domaine de liaison à l'ubiquitine**

La mono-ubiquitination et/ou la poly-ubiquitination peuvent moduler directement l'activité d'une protéine en induisant un changement de conformation au niveau de celle-ci. Par contre, le mécanisme d'ubiquitination peut induire des événements en son aval sans pour autant influencer la structure de la protéine ubiquitinée. Ces événements impliquent plutôt la reconnaissance d'une mono-Ub et/ou d'une chaîne de poly-Ub par des protéines possédant un ou plusieurs domaines de liaison à l'Ub (UBD). Les molécules d'ubiquitines sont donc à ce niveau des marqueurs permettant le recrutement d'autres protéines. Il y a plus d'une vingtaine de famille d'UBD et l'association de ces domaines à une protéine mono-ubiquitinée et/ou poly-ubiquitinée se fait via des interactions hydrophobiques. La majorité des UBD s'associent au mono-Ub, mais ils démontrent une sélectivité d'association envers certains types de chaînes de poly-Ub. Cette sélectivité dépend majoritairement de l'état 3D que les différentes chaînes de poly-Ub adoptent. [171] Un même UBD peut se trouver au sein de différentes protéines. La fonction de signalisation assignée à un UBD dépend donc non seulement de sa sélectivité envers un type de chaîne, mais également de la protéine au niveau de laquelle il est exprimé. Par exemple, le domaine ubiquitin-interacting motif au sein de la sous-unité S5A/RPN10 du protéasome agit en tant que récepteur pour les protéines destinées à la dégradation

tandis qu'il régule les mécanismes de réparation de l'ADN lorsqu'il est exprimé au niveau de la sous-unité Rap80 de la protéine BRCA1. [171,172]

L'une des fonctions des UBD est la formation de complexes multiprotéiques en aval de certains récepteurs activés par leur ligand. En effet, suivant l'activation de la réaction enzymatique E1-E2-E3 plusieurs chaînes de poly-Ub sont synthétisées. Puisque diverses protéines peuvent y être recrutées via leur UBD respectif il y a formation d'une plate-forme multiprotéique. Cette dernière peut être essentielle à la propagation de la signalisation en occasionnant une proximité entre les protéines kinases et leurs substrats.

### **3.1.2.7 Les désubiquitinases**

Tout comme la phosphorylation, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle réversible, elle fait donc intervenir des enzymes nommées désubiquitinases (DUB). Ces dernières, clivent le lien covalent entre les mono-Ub et leur substrat et disjoignent les unes des autres chacune des Ub formant les chaînes de poly-Ub. Il y a environ 85 gènes codant pour de telles enzymes et certaines sont spécifiques à la mono-ubiquitination et/ou à un type de chaîne en particulier. [173]

### **3.1.2.8 Chaînes libres de poly-Ub**

La complexité de l'ubiquitination est révélée par les nombreuses recherches concernant son mécanisme. Notamment, le principe selon lequel la réaction enzymatique E1-E2-E3 induit inévitablement une liaison covalente entre la première ubiquitine d'une chaîne de poly-Ub et une lysine d'une protéine cible fut établi il y a plus d'une vingtaine d'années et fait référence au mécanisme conventionnel de l'ubiquitination. Par contre, en 2009, ce dogme fut démenti puisqu'il a été démontré que les enzymes E1, E2 et E3 ont également la capacité d'induire la formation de chaînes de poly-Ub dont l'extrémité C-terminal de la première ubiquitine n'est pas liée de manière covalente à un résidu lysine d'une protéine cible. Ainsi, ces chaînes de poly-Ub sont dites libres puisque leur extrémité N-terminal est affranchie de toute modification, elles peuvent donc se retrouver disponibles dans le cytoplasme afin de moduler l'activité d'un substrat qui leur est spécifique, en s'y associant de manière non-covalente. [174] Le mécanisme proposé pour la production de ces chaînes de

poly-Ub libres est que la première ubiquitine retrouvée dans la chaîne de poly-Ub se trouverait à être le substrat direct de la E3 ligase. [175] Les chaînes de poly-Ub libres s'associent à l'UBD de leur substrat. Ceci peut occasionner un changement de conformation au sein de la protéine cible régulant ainsi son activation. Ces chaînes peuvent également recruter au niveau d'un même microenvironnement diverses protéines en s'associant à leur UBD afin que ces dernières puissent interagir les une avec les autres.

### **3.1.2.9 L'ubiquitination : cible thérapeutique**

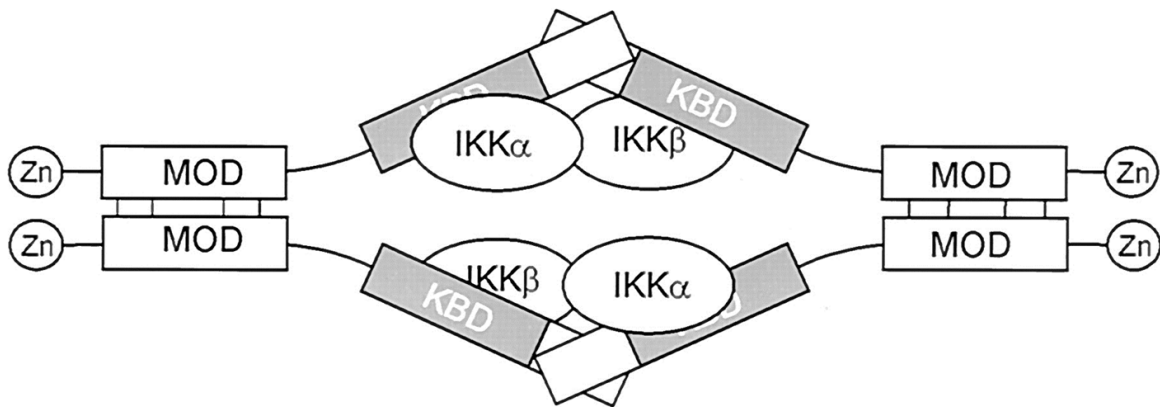
L'ubiquitination est un phénomène dynamique et spécifique impliqué dans de nombreux processus biologiques, dont la dérégulation est associée à diverses maladies. L'ubiquitination représente donc un mécanisme potentiellement modulable par des agents thérapeutiques afin de contrer ses effets adverses. Le bortézomib ainsi que ses dérivés sont les seules drogues disponibles sur le marché en lien avec l'ubiquitination. Par contre, ces molécules ne ciblent pas la réaction enzymatique E1-E2-E3 mais bloquent l'une des conséquences qui lui est associée, soit la dégradation protéique. En effet, ces molécules inhibent le protéasome et non pas la formation des chaînes de poly-Ub en Lys48. [169] Ces drogues occasionnent donc de nombreux effets secondaires puisqu'elles affectent toutes les protéines de la cellule. Afin de minimiser de telles conséquences indésirables, les recherches tendent vers la synthèse de petites molécules inhibant la liaison entre une E3 ligase et son substrat ou vers la synthèse de petits composés inhibant l'activité ligase de la E3. [176,177] La protéine MDM2 est une E3 ligase occasionnant la dégradation du suppresseur de tumeur p53, sa suractivation est donc à l'origine de nombreux cancers. Plusieurs agents thérapeutiques inhibant l'interaction entre la protéine p53 et la E3 ligase MDM2 ont atteint les essais cliniques. À ce jour, seule cette E3 ligase a été ciblée par des composés chimiques chez l'humain. [178] Or, le succès obtenu par ces composés encourage les scientifiques à maximiser leurs efforts en vue du développement de petites molécules non-peptidiques visant d'autres E3 ligases dont la dysfonction est corrélée à une pathologie, dont des maladies cardiovasculaires, telles l'hypertension et l'athérosclérose.

Plusieurs facteurs de risque sont à l'origine du développement de l'hypertension et de l'athérosclérose, dont l'Ang II. En effet, en accord avec plusieurs observations *in vitro*, des études *in vivo* indiquent que cet octapeptide induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et favorise ainsi le développement de ces pathologies. [179] La réponse inflammatoire de l'Ang II est majoritairement dépendante de l'activation du complexe IKK dans divers types cellulaires dont les CMLV. [180] Les mécanismes d'activation de ce complexe font intervenir des kinases et des E3 ligases, soit des protéines modulables par des composés chimiques. Ainsi, la détermination des protéines impliquées au niveau de son activation permettra d'établir les meilleures stratégies afin de moduler son activité lorsque sa dérégulation est la cause de maladies. De plus, puisque ce complexe possède une activité phosphotransférase, il s'avère être lui-même une cible thérapeutique potentielle.

#### **4.0 Le complexe IKK**

Le complexe IKK est représenté par deux sous-unités catalytiques et une sous-unité structurale. Les deux composantes catalytiques, IKK $\alpha$  (IKK-1) et IKK $\beta$  (IKK-2), sont des kinases. Elles régulent donc le devenir de leurs substrats via leur activité phosphotransférase. La composante structurale, soit IKK $\gamma$  connue aussi sous le nom de NF-kB Essential Modulator (NEMO), fut identifiée une année suivant la découverte des sous-unités catalytiques. [181,182] Les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  ont une structure tridimensionnelle similaire, c'est-à-dire qu'elles sont toutes deux composées d'un domaine catalytique en leur N-terminal, d'un domaine leucine zipper en leur centre et d'un motif hélice-boucle-hélice en leur C-terminal. Elles ont la capacité de former des homo- ou hétérodimères via leur domaine leucine zipper. Leur interaction avec IKK $\gamma$  est médiée par une séquence de 40 acides aminés retrouvée en leur extrême extrémité C-terminal. [183] Le complexe IKK est au final formé de deux dimères catalytiques et d'un tétramère structural. (Figure.11) [184]

Malgré leur présence dans le même complexe, leurs similarités structurales et une homologie de séquence de 52%, les deux sous-unités catalytiques du complexe IKK ont des fonctions et des substrats distincts. En effet, des études génétiques ont



**Figure. 12: Le complexe IKK.**

Les sous-unités  $IKK\gamma$  possèdent un domaine de dimérisation en leur C-terminal, soit un doigt de zinc. La dimérisation antiparallèle de deux dimères d' $IKK\gamma$  est à l'origine de leur tétramérisation. Cette conformation assure la formation de deux cavités où les dimères catalytiques  $IKK\alpha/IKK\alpha$ ,  $IKK\beta/IKK\beta$  et/ou  $IKK\alpha/IKK\beta$  peuvent s'associer au tétramère via leur liaison au domaine de liaison kinasique retrouvé au niveau des sous-unités  $IKK\gamma$ . KBD : kinase binding domain ; MOD : minimal oligomerization domain; Zn : Zinc. *Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C (2003) Mol Cell Biol 23: 2029-2041.*

démonstré que des souris déficientes en  $IKK\alpha$  présentent plusieurs anomalies morphogénétiques et meurent immédiatement après la naissance tandis que des souris déficientes en  $IKK\beta$  meurent à l'état embryonnaire et présentent une dégénérescence hépatique. Des études *in vitro* ont également démontré qu' $IKK\alpha$  est impliquée, entre autres, dans la maturation des cellules B et dans la formation des organes lymphoïdes secondaires tandis qu' $IKK\beta$  est impliquée notamment au niveau de la signalisation anti-apoptotique et inflammatoire. [185] Ainsi, lorsque le complexe IKK est à l'origine d'un désordre inflammatoire c'est principalement la sous-unité catalytique  $IKK\beta$  qui est impliquée. Une étude a notamment démontré que l'activité phosphotransférase d' $IKK\beta$ , et non celle d' $IKK\alpha$ , est impliquée dans le développement de l'asthme lorsqu'il y a inflammation de l'épithélium bronchique. [186] Il a également été déterminé dans un modèle *in vivo* que seul la sous-unité  $IKK\beta$  est essentielle à la

perte osseuse associée à l'inflammation. [187] IKK $\beta$  est donc la sous-unité catalytique à préconiser en tant que cible thérapeutique potentielle lors de maladies inflammatoires causées par l'activation du complexe IKK. Qui plus est, il a récemment été démontré que, chez des souris n'exprimant pas de récepteurs pour les LDL, l'abrogation génétique sélective d'IKK $\beta$  au niveau des cellules myéloïdes diminue significativement les lésions athérosclérotiques induites par une diète riche en lipides. [188] Ainsi, la démystification des voies de signalisation impliquées dans l'activation d'IKK $\beta$  est importante à l'établissement d'un arsenal thérapeutique pour contrer les pathologies inflammatoires, telle l'athérosclérose.

#### **4.1 Découverte du complexe IKK : NF- $\kappa$ B**

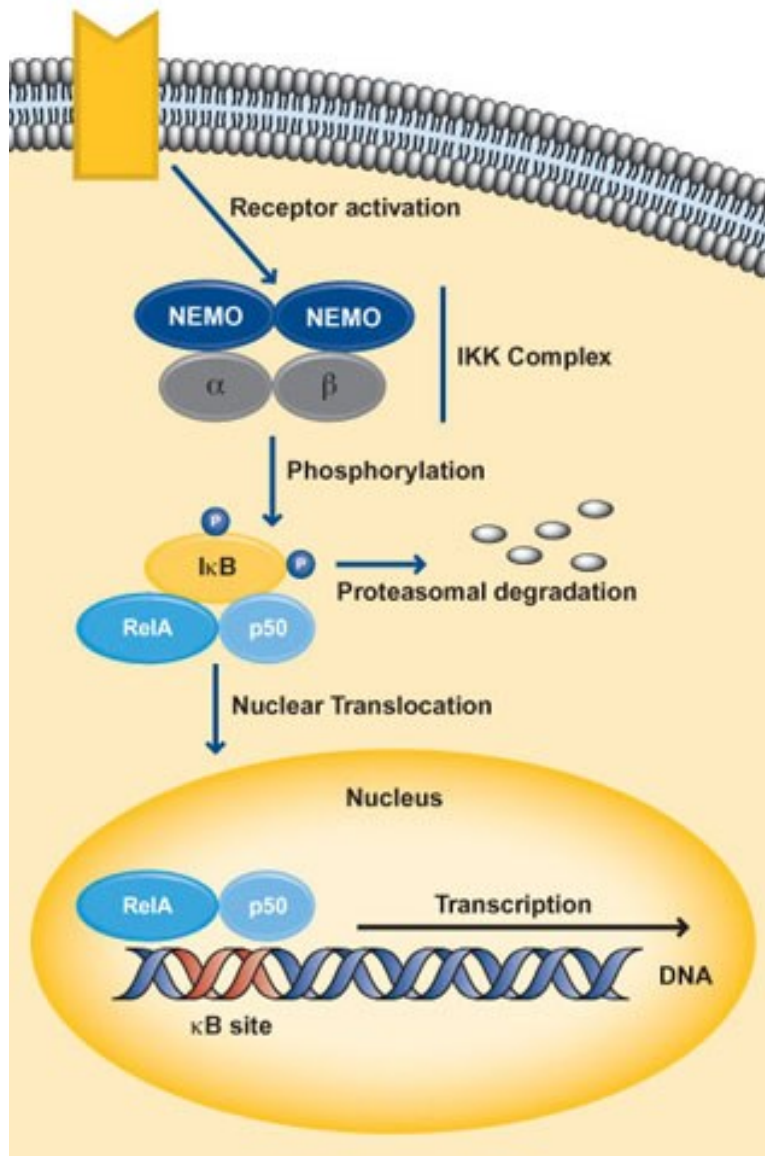
Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est à l'origine de l'identification du complexe IKK. NF- $\kappa$ B fut découvert en 1986 par le Dr. Ranjan, suite à diverses expériences faisant intervenir une technique permettant de détecter une interaction entre une protéine et de l'ADN. En effet, la protéine NF- $\kappa$ B fut isolée d'un élément régulateur  $\kappa$ B connu pour favoriser la transcription de la chaîne légère kappa des immunoglobulines dans les lymphocytes B. [189] Il a rapidement été démontré que NF- $\kappa$ B n'est pas restreint aux cellules immunitaires. Il est plutôt ubiquitaire chez les cellules eucaryotes où il est un élément clé dans la régulation de l'expression de gènes essentiels, entre autres, à la prolifération, à la différenciation, à la croissance cellulaire, à la réponse immunitaire et à l'inflammation. NF- $\kappa$ B est représenté par une famille de facteurs de transcription qui comprend un ensemble de protéines dimériques formées à partir de cinq sous-unités, soit NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), c-V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog (c-Rel), RelB et/ou RelA (p65). Les sous-unités p50 et p52 sont produites suite au clivage de leur précurseur respectif, p105 et p100. Les différents complexes ont une sélectivité de fixation et d'affinité pour les nombreux sites  $\kappa$ B existant au niveau des promoteurs. Les cinq sous-unités possèdent un domaine d'homologie en leur extrémité N-terminal, soit le domaine Rel qui participe au processus de dimérisation ainsi que de fixation à l'ADN. Ce domaine interagit également avec une molécule inhibitrice. En effet, au niveau de cellules quiescentes, NF- $\kappa$ B se trouve séquestré dans le cytoplasme par des sous-



unités inhibitrices de la famille IκB (IκBα, IκBβ et IκBε). Ces dernières présentent plusieurs motifs répétés, de type ankyrine, qui masquent le signal de localisation nucléaire (SLN) de NF-κB. La translocation de NF-κB au noyau est engendrée rapidement par divers stimuli. Ces signaux permettent le dévoilement du SLN de NF-κB en induisant sa libération des sous-unités inhibitrices IκB. [190]

#### 4.1.2 Voies canoniques d'activation de NF-κB

L'hétérodimère NF-κB typique retrouvé au niveau du cytoplasme est composé des sous-unités p50/p65 qui est principalement inhibé par la sous-unité IκBα. Les cytokines inflammatoires, tels le facteur de nécrose tumorale (TNFα) et l'interleukine-1 (IL-1β) ainsi que les produits bactériens, les antigènes reconnus par les récepteurs des cellules T (TCR) et certains agonistes des RCPG, tel l'acide lysophosphatidique (LPA), induisent la phosphorylation d'IκBα. Cette modification post-traductionnelle est à l'origine de l'association entre IκBα et le complexe SCF/β-TrCP, soit un complexe E3 ligase produisant des chaînes de poly-ubiquitines de type Lys48. (Figure. 13) La phosphorylation d'IκBα occasionne donc son ubiquitination en Lys48 et conséquemment sa dégradation par le protéasome. Le complexe p50/p65 est ainsi libéré de l'emprise de son inhibiteur et peut dès lors transloquer au noyau. Au final, l'étape initiale à l'activation de NF-κB est la phosphorylation d'IκBα au niveau des résidus sérines 32 et 36. En 1997, onze ans suivant la découverte de NF-κB, deux IκB kinases ont été isolées par des méthodes de chromatographie standard suite à une stimulation au TNFα de cellules *in vitro*. Ces dernières s'avérèrent être les kinases IKKα et IKKβ. [181,182] Le complexe IKK tire donc son nom de la première fonction qui lui a été attribuée, soit IKK pour IκB kinase. La sous-unité IKKβ est la kinase cruciale à la phosphorylation d'IκBα et son association à IKKγ est essentielle à son activité phosphotransférase envers cette sous-unité inhibitrice. Cette signalisation, dont la translocation de la sous-unité p50/p65 dépend de la dégradation d'IκBα suite à sa phosphorylation par IKKβ en présence d'IKKγ, correspond à la voie canonique d'activation de NF-κB. (Figure. 13) [191]



**Figure. 13 : Voie canonique d'activation de NF-κB.**

L'hétérodimère NF-κB formé des sous-unités p50 et p65 (RelA) est communément séquestré dans le cytoplasme en raison de son association à la protéine IκB. Or, suivant la liaison d'un ligand à son récepteur, la sous-unité catalytique IKKβ est activée et induit, dépendamment de son association à IKKγ, la phosphorylation d'IκB. La phosphorylation d'IκB est prémisses à sa poly-ubiquitination en Lys48 et donc à sa dégradation par le protéasome. Une fois la sous-unité IκB dégradée, NF-κB est libéré de l'emprise de son inhibiteur et transloque au noyau. NEMO : NF-κB Essential Modulator; IKK : IκB kinase; P: phosphate

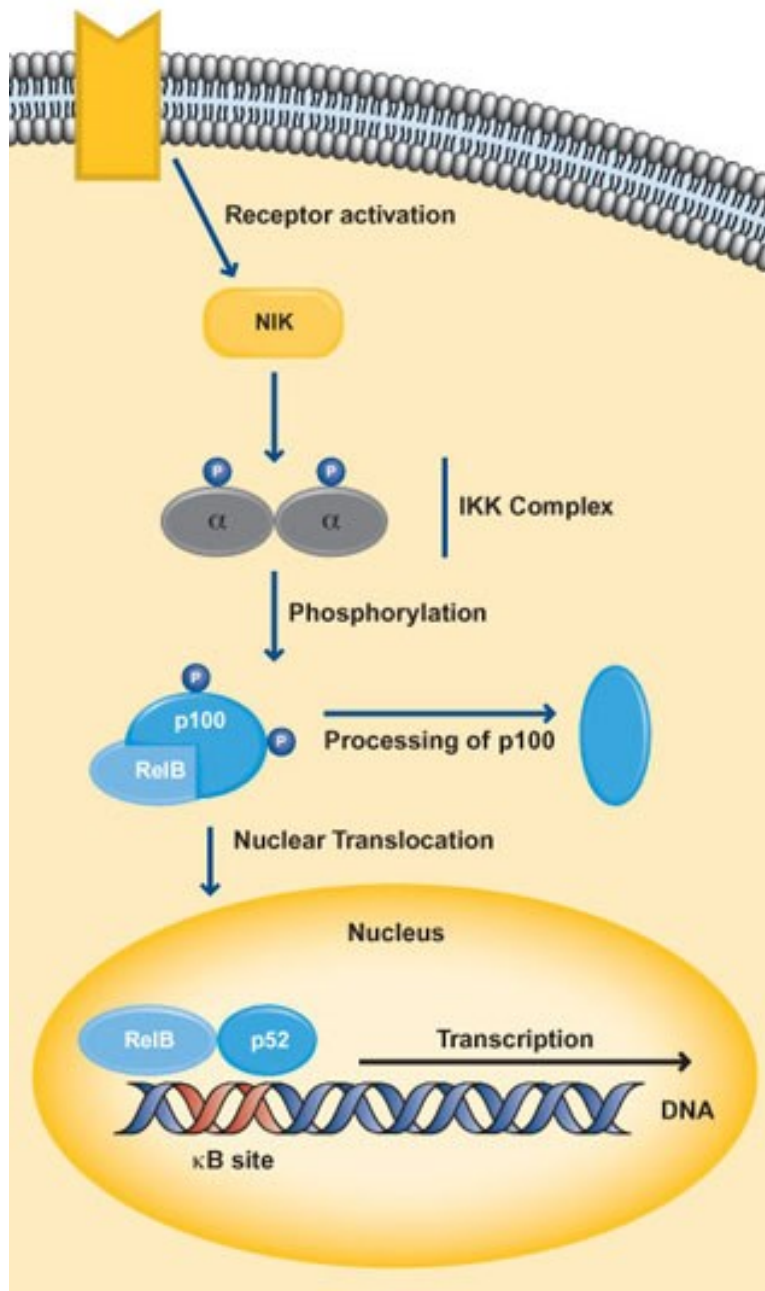


### 4.1.3 Voies non canoniques d'activation de NF- $\kappa$ B

Les voies non canoniques sont activées par différents stimuli, tels le CD40L, la lymphotoxine- $\beta$  et plusieurs autres molécules, dont l'Ang II. Chacun de ces agonistes induit une cascade de signalisation qui lui est propre afin d'activer NF- $\kappa$ B, indépendamment de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Par exemple, en réponse au CD40L et à la lymphotoxine- $\beta$ , la protéine NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) phosphoryle le segment d'activation d'IKK $\alpha$  afin d'induire son activité phosphotransférase. Celle-ci acquiert donc la capacité de phosphoryler la protéine p100 du complexe p100/RelB, et ce, indépendamment d'IKK $\beta$  et d'IKK $\gamma$ . La phosphorylation de p100 induit sa dégradation partielle et ainsi la génération d'un complexe p52/RelB, un dimère transcriptionnellement actif. (Figure. 14) [192] Par ailleurs, en réponse à l'Ang II, la kinase IKK $\beta$  phosphoryle directement la sous-unité p65, ce qui permettrait la dissociation du complexe p50/p65 de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ . [193]

### 4.1.4 NF- $\kappa$ B : Un point de convergence

NF- $\kappa$ B est un important facteur de transcription régulant la réponse inflammatoire au niveau de la vasculature. Il a été démontré qu'il est activé dans les CMLV, les macrophages et les cellules endothéliales lorsqu'il y a présence de lésions athérosclérotiques. [194] Suite à cette observation, une relation directe entre l'activation de NF- $\kappa$ B et le développement de l'athérosclérose a été établie classant ainsi cette pathologie dans la catégorie des maladies inflammatoires, au même niveau que l'arthrite rhumatoïde. De nombreux effecteurs participant au développement de cette maladie ont la capacité d'activer NF- $\kappa$ B, tels les dommages physiques au niveau de l'endothélium, les oxy-LDL, les agents infectieux, les ROS et diverses cytokines. Ce facteur de transcription est donc un point de convergence pour plusieurs agonistes associés à l'athérosclérose. Or, aujourd'hui, un second point de convergence a été défini et correspond au complexe IKK, plus particulièrement à sa sous-unité catalytique IKK $\beta$  puisque cette kinase se trouve en amont de NF- $\kappa$ B en réponse à ces nombreux stimuli. Ainsi, en raison de son rôle central et de son activité catalytique, IKK $\beta$  est considéré comme l'une des cibles thérapeutiques les plus



**Figure. 14 : Voie non canonique d'activation de NF- $\kappa$ B.**

Suivant la liaison d'un ligand à son récepteur, la protéine NIK est activée et induit la phosphorylation/activation de la kinase IKK $\alpha$ . Celle-ci phosphoryle la protéine p100 du complexe p100/RelB indépendamment de son association à IKK $\gamma$ . La phosphorylation de p100 induit sa dégradation partielle et ainsi la génération d'un complexe p52/RelB, un dimère transcriptionnellement actif. IKK : I $\kappa$ B kinase ; NIK : NF- $\kappa$ B-inducing kinase ; P : phosphate.



attrayantes pour générer de nouveaux inhibiteurs spécifiques à la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. [195] L'identification des effecteurs régulant l'activation d'IKK $\beta$  est également de mise puisqu'elle permettra de déterminer d'autres cibles thérapeutiques potentielles et contribuera ainsi à l'accroissement des probabilités de découvrir un traitement plus spécifique aux pathologies associées à NF- $\kappa$ B.

## **4.2 Régulation de l'activité du complexe IKK**

L'activation du complexe IKK dépend de deux modifications post-traductionnelles : la phosphorylation et l'ubiquitination. Ainsi, la régulation de son activité fait intervenir plusieurs effecteurs, dont des effecteurs positifs, soit les kinases et les E3 ligases ainsi que des effecteurs négatifs, soit les phosphatases et les DUBs.

La phosphorylation s'effectue au niveau des résidus sérines 177 et 181 situées dans le segment d'activation du domaine catalytique d'IKK $\beta$ . [191] Deux principales IKK kinases ont été identifiées, soit la protéine transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) et la protéine mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MEKK3). [196,197] Outre sa phosphorylation par des kinases, il y a également des évidences qui suggèrent qu'IKK $\beta$  peut se trans-autophosphoryler. [191]

En ce qui concerne l'ubiquitination, c'est la sous-unité structurale IKK $\gamma$  qui est la cible du mécanisme enzymatique faisant intervenir les protéines E1-E2-E3, de manière directe via sa propre poly-ubiquitination ou de manière indirecte via la liaison de l'un de ses UBD à des chaînes de poly-Ub. Les E3 ligases les plus caractérisées concernant le mécanisme d'ubiquitination visant la sous-unité structurale du complexe IKK font partie de la famille TNF receptor-associated factor (TRAFs). [198]

### **4.2.1 TAK1**

La protéine TAK1 fut découverte en 1995 par Matsumoto et ses collègues. Elle est une sérine/thréonine kinase initialement identifiée en tant que MAPKKK au niveau des voies de signalisation induites par les ligands de type transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ). [199] Les cascades de signalisation faisant intervenir les MAPKKK sont parmi les voies signalétiques les plus étudiées et suivent toutes le même schéma : en

réponse à un agoniste, une MAPKKK active une MAPKK qui active une MAPK. Ainsi, TAK1, en réponse à divers agonistes, active les MAPKK 3/6 ainsi que les MAPKK 4/7 qui activent à leur tour les MAPK p38 et JNK respectivement, soit deux protéines impliquées au niveau de la prolifération, de la différenciation, de la survie et de la migration cellulaire. [200,201] Il a par la suite été déterminé que TAK1 n'est pas restreint aux voies de signalisation MAPKKK dépendantes mais que cette kinase est activée au sein de plusieurs autres cascades de signalisation, dont celles menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. [201,202]

TAK1 forme un complexe avec les protéines structurales TAB1, TAB2 et/ou TAB3. TAB1 se lie au domaine N-terminal de la kinase tandis que les sous-unités TAB2 et TAB3 s'associent à son domaine C-terminal. [203] TAB2 et TAB3 partagent une homologie de séquence et de structure tandis que TAB1 est distincts. Ainsi, TAB1 à des fonctions qui lui sont uniques tandis que les fonctions de TAB2 et de TAB3 sont compensatoires. [204] L'autophosphorylation de TAK1 au sein de son segment d'activation est essentielle pour l'activation de la kinase et dépend d'un changement de conformation au niveau de cette protéine. Ce dernier phénomène, en réponse aux stress osmotiques est dépendant de l'oligomérisation de TAK1 via la sous-unité TAB1. [205] Par contre, en réponse aux cytokines il est dépendant de l'association des sous-unités TAB2 et/ou TAB3 à des chaînes de poly-Ub en Lys63. [204]

La capacité de TAK1 à induire l'activation de NF- $\kappa$ B via l'activation d'IKK $\beta$  a promu cette kinase au rang des protéines pro-inflammatoires. Qui plus est, la délétion inducible de TAK1 chez des souris cause une diminution de l'inflammation et de la fibrose rénale ainsi que la diminution de l'inflammation associée aux réponses allergiques. [206,207]

#### **4.2.2 MEKK3**

À l'instar de TAK1, la protéine MEKK3 est une MAPKKK. Des études génétiques chez la souris ont révélé que les membres de la famille MAPKKK ont des fonctions communes et d'autres, distinctes. Ainsi, MEKK3 tout comme TAK1 a la capacité d'activer les MAPK p38 et JNK. Mais MEKK3, au contraire de TAK1, est

apte à activer ERK5, une protéine est impliquée dans la différenciation, la prolifération et la croissance cellulaire. Elle est également essentielle au développement cardiovasculaire. [208] En plus de son rôle au niveau de l'activation des MAPK, il a été démontré que MEKK3 a la capacité d'activer NF- $\kappa$ B. [209,210]

Malgré les nombreuses recherches encourues, le mode d'activation de MEKK3 est toujours nébuleux. Une récente étude démontre que MEKK3 est présent sous forme de dimères au niveau du cytoplasme et que sa trans-autophosphorylation est à l'origine de son activation. Par contre, en absence de stimuli la protéine 14-3-3 s'associe au dimère et restreint la capacité du dimère MEKK3 à se trans-autophosphoryler. Le mécanisme à l'origine de la dissociation de la protéine 14-3-3 du dimère MEKK3 en réponse à un agoniste est toujours inconnu. [211]

Bien que deux études supportent le rôle de MEKK3 au niveau de la phosphorylation d'IKK $\beta$ , l'analyse de l'ensemble des études concernant les IKK kinases suggère que TAK1 est la principale kinase responsable de la phosphorylation d'IKK $\beta$ . [212] Certaines données démontrent que les voies faisant intervenir MEKK3 pour l'activation du complexe IKK sont redondantes aux voies impliquant TAK1. [213]

#### **4.2.3 Phosphatases**

Malgré les progrès significatifs réalisés dans la compréhension des mécanismes à l'origine de la phosphorylation d'IKK $\beta$ , les événements à l'origine de sa déphosphorylation sont peu caractérisés. Toutefois, en 2009, les protéines phosphatases PPM1A et PPM1B ont été identifiées en tant que protéines phosphatases d'IKK $\beta$ . [214] En effet, elles furent découvertes suivant le criblage d'une banque de sérine/thréonine phosphatases, dont la surexpression induit la déphosphorylation/inactivation d'IKK $\beta$  en réponse au TNF $\alpha$ . Au cours de cette même année, une seconde équipe de recherche a démontré que la phosphatase PP2A induit également la déphosphorylation/inactivation d'IKK $\beta$  en réponse à l'IL-1 $\beta$ . [215] Les kinases en amont d'IKK $\beta$  sont également régulées négativement. En effet, deux phosphatases ont été déterminées pour TAK1, soit PP2C ainsi que PP6, et une établie pour MEKK3, soit PP2A. [216-218]

#### 4.2.4 TRAFs

La famille des protéines TRAFs comporte sept membres, soit TRAF1 à TRAF7. [219] Toutes ces protéines possèdent un TRAF domaine qui est constitué d'une superhélice hélice alpha hautement conservée suivie d'un domaine TRAF-C lui-même formé par deux feuillets beta se repliant sur eux-mêmes. (Figure. 15) [220] Le domaine TRAF permet l'oligomérisation des protéines TRAFs ainsi que leur association à des récepteurs et des effecteurs de la signalisation. Ces protéines ont donc d'abord été définies en tant que protéines adaptatrices. [221] Leur extrémité N-terminal est composée d'un ou plusieurs motifs de type doigt de zinc et, à l'exception de TRAF1, d'un RING domaine. (Figure. 15) Les protéines TRAF2 à TRAF7 sont donc des E3 ligases de la famille RING qui participent aux mécanismes d'ubiquitination. [219]

Les voies de signalisation dépendantes de l'activité E3 ligase des protéines TRAFs résultent généralement à l'activation de NF- $\kappa$ B, de certaines MAPK et/ou à l'activation de facteurs de transcription impliqués tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative. Ainsi, les TRAFs régulent divers processus cellulaires, dont la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que la production de cytokines et de molécules de défense. [219,222]

Les principales TRAFs impliquées dans l'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B, et conséquemment du complexe IKK, sont TRAF2, TRAF5 et TRAF6. Leur oligomérisation respective induit leur activité E3 ligase et afin de synthétiser des chaînes de poly-Ub, elles agissent avec la E2 Ubc13 qui est restreinte à la formation de chaînes de poly-Ub en Lys63 et/ou avec la E2 Ubch5 qui a la capacité de produire des chaînes de poly-Ub de différents types. [174,223,224] TRAF2 et TRAF5 sont hautement homologues et participent à des voies de signalisation redondantes afin d'induire l'activation du complexe IKK tandis que TRAF6 participe à des voies de signalisation qui lui sont propres. Cette spécificité de signalisation est basée sur la capacité des TRAFs à interagir avec des protéines spécifiques. Ainsi, dans le but d'activer IKK, TRAF6 n'opère pas au niveau des mêmes substrats que TRAF2 et





**Figure. 15 : Les protéines TRAFs**

Six des sept protéines TNF receptor-associated factor (TRAFs) sont représentées. Leur extrémité C-terminal est composée d'un TRAF domaine qui est constitué d'une superhélice hélice alpha hautement conservée (CC) et d'un domaine TRAF-C. Leur extrémité N-terminal est composée d'un ou plusieurs motifs de type doigt de zinc (Z) et, à l'exception de TRAF1, d'un RING domaine (R) qui est responsable de leur activité E3 ligase. Häcker H, Tseng PH, Karin M (2011) *Nature Reviews Immunology* 11 :457-468

TRAF5. En effet, TRAF6 est impliquée dans les mécanismes d'ubiquitination d'IKK $\gamma$  et de TAB2 tandis que TRAF2 et TRAF5 dans ceux de la kinase receptor-interacting protein-1 (RIP-1). [223-225]

#### 4.2.5 DUBs

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle contrecarrée par les DUBs. En effet, ces dernières ont la capacité de cliver les chaînes de poly-Ub synthétisées par les E3 ligases. Les DUBs majoritairement impliquées dans la régulation négative de NF- $\kappa$ B sont les protéines tumor suppressor cylindromatosis protein (CYLD) et A20. Ces dernières clivent toutes deux des chaînes de poly-Ub en Lys63 et agissent au niveau des mêmes substrats, tels IKK $\gamma$ , TAB2 et RIP-1. [226]

Malgré ces similitudes, ces DUBs possèdent des caractéristiques distinctes. En effet, CYLD clive uniquement des chaînes de poly-Ub en Lys63 et démontre une efficacité plus élevée envers les chaînes libres que les chaînes liées de manière covalente à leur substrat. [227] A20 quant à elle a la capacité de cliver non seulement des chaînes de poly-Ub en Lys63, mais également en Lys48. Par contre, elle n'a pas la faculté de cliver des chaînes libres de poly-Ub en Lys63. Or, elle est une DUBs unique en son genre puisqu'elle possède une activité E3 ligase. En effet, A20 clive les chaînes de poly-Ub en Lys63 au niveau d'un substrat donné via son activité désubiquitinase et y synthétise des chaînes de poly-Ub en Lys48 via son activité ligase, et ce, afin de le soumettre à la dégradation. [228]

Une régulation inadéquate de l'activité d'IKK $\beta$  est associée à des pathologies. Une suractivation de cette kinase est à l'origine de maladies pro-inflammatoires tandis qu'une sous-activation est associée à une réponse immunitaire déficiente. Tous les médiateurs cellulaires impliqués dans la régulation de l'activité d'IKK $\beta$  doivent donc agir de concert afin d'assurer une homéostasie au niveau des voies de signalisation dépendantes de cette kinase et ainsi favoriser un fonctionnement opportun des processus cellulaires.

#### **4.2.6 IKK $\beta$ : Un point de convergence**

IKK $\beta$  est un point de convergence pour plusieurs stimuli, et dans tous les cas son activation dépend de la phosphorylation et de l'ubiquitination. En revanche, les divers agonistes, tels le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPA activent IKK $\beta$  via une signalisation qui leur est propre, et ce, au sein de divers types cellulaires, dont les fibroblastes et les cellules épithéliales. La spécificité de leur signalisation dépend de la nature des protéines adaptatrices recrutées au récepteur qu'ils activent. [198,218] Comparativement à ces agonistes, la ou les voies de signalisation occasionnant l'activation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II sont peu caractérisées. Par contre, des hypothèses sur les mécanismes moléculaires que l'Ang II engendre afin d'activer IKK $\beta$  dans un type cellulaire donné, telles les CMLV peuvent être émises à partir des modèles déjà établis pour le TNF $\alpha$ , l'IL1- $\beta$  et le LPA.

#### 4.2.6.1 TNF $\alpha$

Le TNF $\alpha$  est une cytokine trimérique qui induit ses cascades de signalisation suite à sa liaison à l'un de ses deux récepteurs, soit le récepteur TNF1 (TNFR1) ou le récepteur TNF2. [229] Plusieurs approches expérimentales ont démontré que la majorité de la signalisation initiée par cette cytokine survient à la suite de son association au TNFR1. [230] La stimulation de ce dernier y induit le recrutement de la protéine TNFR1-associated death domain (TRADD) et subséquemment le recrutement de la protéine FAS-associated death domain (FADD) et de la kinase RIP1. L'association des protéines FADD aux protéines TRADD induit la signalisation apoptotique tandis que l'association de la kinase RIP1 aux protéines TRADD résulte en l'activation de NF- $\kappa$ B, soit l'hétérodimère p50/p65. [198] La modification post-traductionnelle clef pour l'activation de ce facteur de transcription est l'ubiquitination. En effet, la synthèse de chaînes de poly-Ub en Lys63, en Lys11 et linéaires permet l'assemblage d'un complexe protéique au TNFR1 à l'origine de la signalisation. Cependant, l'importance de chacun des sous-types de chaînes est toujours débattue. [231]

Ainsi, le modèle présentement préconisé illustre que l'activité kinase de RIP1 n'est pas impliquée dans l'activation du complexe IKK et donc dans la stimulation de p50/p65, mais que sa poly-ubiquitination est primordiale. (Figure. 16) [213] En effet, la mobilisation des protéines TRADD au TNFR1 en réponse au TNF $\alpha$  provoque le recrutement des E3 ligases TRAF2 et TRAF5. Il est à noter que TRAF2 et TRAF5 sont considérées comme une seule entité (TRAF2/5) dans ce modèle puisque l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse au TNF $\alpha$  n'est pas affectée dans les fibroblastes embryonnaires de souris où le gène codant uniquement pour TRAF2 ou uniquement pour TRAF5 est absent. Par contre, elle est considérablement réduite lorsque les deux gènes sont absents simultanément ce qui démontre une redondance fonctionnelle entre ces deux E3 ligases. [232] L'activité ligase de l'entité TRAF2/5 est facultative pour l'activation de p50/p65. En effet, sa fonction essentielle repose sur sa capacité à s'associer et donc à recruter deux autres E3 ligases au TNFR1, soit les E3 ligases cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) et cIAP2 qui sont responsables

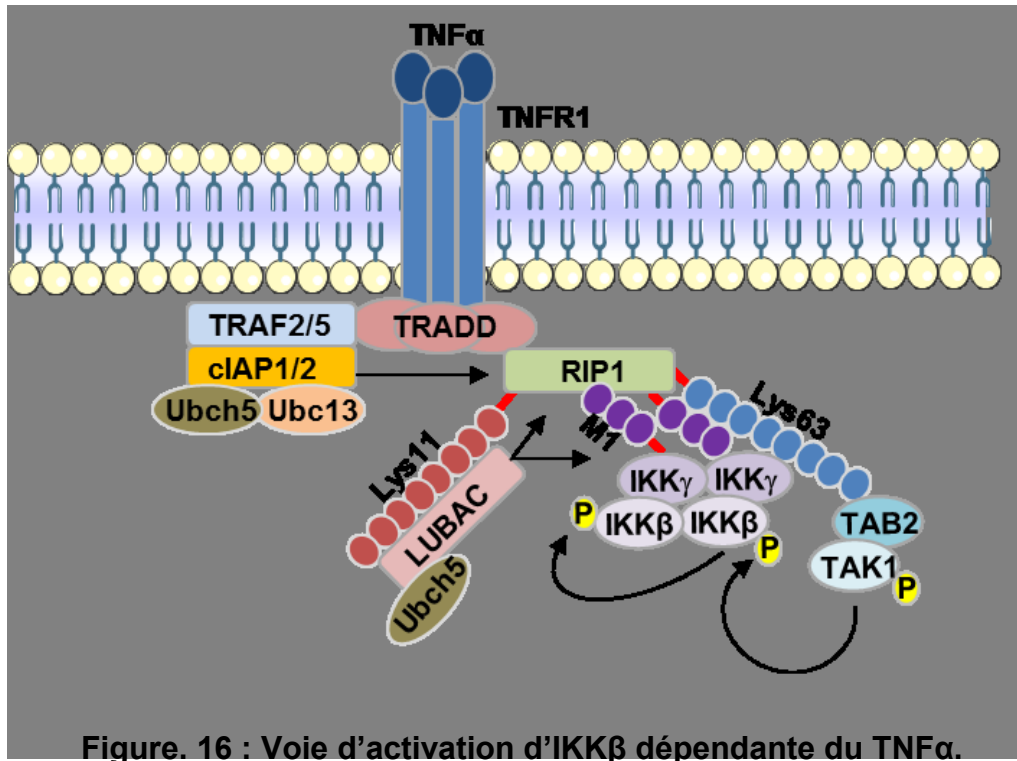


Figure. 16 : Voie d'activation d'IKK $\beta$  dépendante du TNF $\alpha$ .

Le TNF $\alpha$  induit la trimérisation du TNFR1 ce qui résulte au recrutement de TRADD, de RIP1 et des E3 ligases TRAF2 et TRAF5. Ces dernières agissent en tant que protéines adaptatrices pour les E3 ligases cIAP1 et cIAP2. RIP1 est poly-ubiquitinée en Lys63 par cIAP1/2 et la E2 Ubc13 ce qui y induit le recrutement du complexe TAK1/TAB2 via l'UBD de TAB2 ainsi que le recrutement du complexe IKK via l'UBD d'IKK $\gamma$ . L'activation de TAK1 est dépendante de la liaison de TAB2 aux chaînes de poly-Ub en Lys63 tandis que l'activation du complexe IKK dépend de la phosphorylation d'IKK $\beta$  par TAK1 et par la suite de sa capacité à se transphosphoryler. RIP1 est également poly-ubiquitinée en Lys11 par cIAP1/2 et la E2 Ubch5 ce qui y induit le recrutement du complexe LUBAC qui en conjonction avec Ubch5 y synthétise des chaînes de poly-Ub linéaires (M1) au niveau de RIP1 et d'IKK $\gamma$  afin de stabiliser le complexe protéique. Cette consolidation est aussi occasionnée par la capacité d'IKK $\gamma$  à s'associer via un second UDB à ce type de chaînes. Traits rouges : liaison covalente entre un résidu Lys de la protéine cible et l'Ub. *Figure par Priscilla Doyon.*

de la poly-ubiquitination en Lys63 et en Lys11 de RIP1 en conjonction respectivement avec la E2 Ubc13 et la E2 Ubch5. (Figure. 16) [233,234] cIAP1 et cIAP2 ont d'abord été identifiées en tant que protéines impliquées dans la survie cellulaire. Or, plusieurs études ont révélé que ces E3 ligases de la famille RING sont également importantes dans la régulation de la production de cytokines impliquées dans l'inflammation et l'immunité en participant aux voies de signalisation activant les MAPK et NF- $\kappa$ B. [235] La poly-ubiquitination de RIP1 en Lys63 par cIAP1 et cIAP2 induit le recrutement du complexe TAK1/TAB2 à RIP1 puisque TAB2 possède en son C-terminal un UBD de type doigt de zinc qui s'associe préférentiellement aux chaînes de poly-Ub en Lys63. (Figure. 16) [236] L'association de TAB2 à ces dernières provoque un changement de conformation au sein de TAK1 ce qui résulte en son autophosphorylation et, de ce fait, en son activation. Le complexe IKK est également recruté aux chaînes de poly-Ub en Lys63 liées à RIP1, car la sous-unité IKK $\gamma$  possède en son C-terminal, tout comme TAB2, un UBD de type doigt de zinc. [236] La poly-ubiquitination en Lys63 de RIP1 est donc responsable du rapprochement entre TAK1 et le complexe IKK. À ce stade, puisque TAK1 est actif, cette proximité permet à cette kinase de phosphoryler et ainsi d'activer son substrat IKK $\beta$ , soit la composante catalytique du complexe IKK qui est à l'origine de l'activation de l'hétérodimère p50/p65. Quant à la poly-ubiquitination de RIP1 en Lys11 par cIAP1 et cIAP2, elle induit le recrutement du complexe linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), soit une E3 ligase composée des protéines heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1 (HOIL-1), HOIL1-interacting protein (HOIP) et SHANK-associated RH domain interacting protein (SHARPIN). (Figure. 16) Le complexe LUBAC induit la synthèse de chaînes de poly-Ub linéaires (M1) au niveau de RIP1 et d'IKK $\gamma$  ce qui est essentiel à la stabilisation du complexe protéique puisque l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle très labile. [237] De plus, IKK $\gamma$  possède un second UBD en son centre, soit le domaine UBAN qui s'associe préférentiellement aux chaînes linéaires. [238] Cette association induit un changement de conformation au sein du complexe IKK qui contribue à l'efficacité de son activation et également à la stabilisation du complexe protéique. [239] Ainsi, au sein de ce microenvironnement stable, TAK1 peut

efficacement phosphoryler/activer IKK $\beta$  afin que cette dernière phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  et induise ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B.

#### 4.2.6.1.1 Pathologie associée au TNF $\alpha$ : Accent sur l'athérosclérose

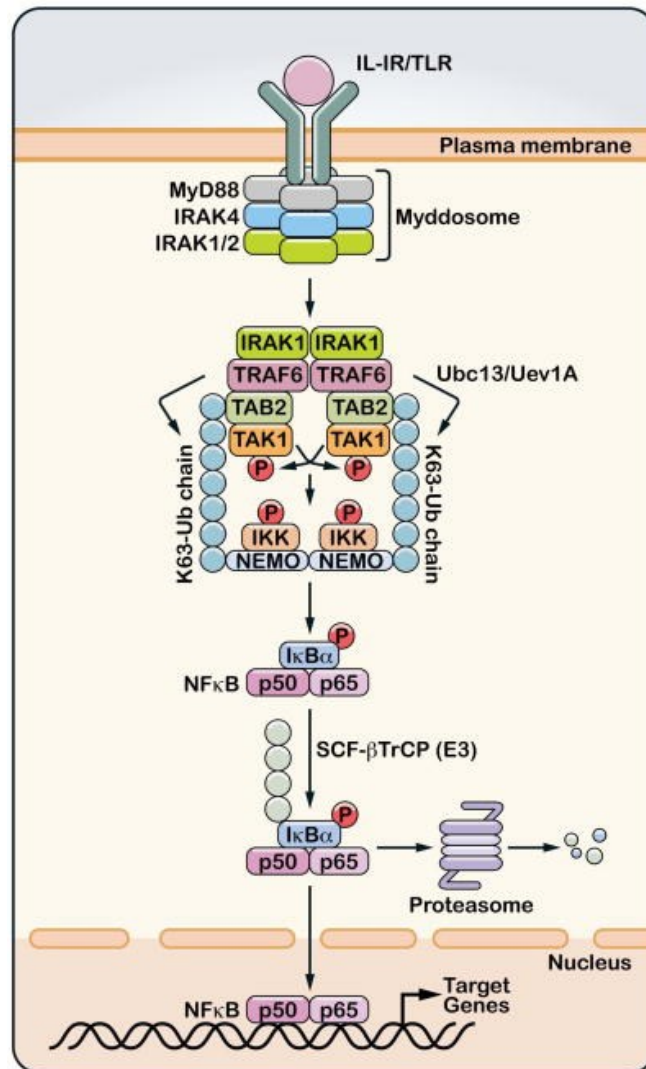
Le TNF $\alpha$  est intimement lié au développement de l'athérosclérose. Cette cytokine est présente dans les plaques athérosclérotiques chez l'humain. De plus, une concentration sanguine élevée de TNF $\alpha$  due à des facteurs de risque de l'athérosclérose, tels le diabète et l'obésité, est associée à la récurrence des infarctus du myocarde et à l'épaississement de l'intima. [240] Au cours des événements précoces de l'athérosclérose, les dommages physiques à l'endothélium et les oxy-LDL, stimulent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Ces protéines d'adhésion, soit ICAM-1 et VCAM-1 induisent le recrutement des monocytes circulant à l'endothélium des artères. Ce phénomène est la prémisse à leur infiltration dans l'intima où ils se différencient en macrophages. Ces derniers se transforment en cellules spumeuses suivant la phagocytose des oxy-LDL. [139] Les macrophages/cellules spumeuses créer un environnement inflammatoire au site de la lésion vasculaire en y sécrétant des cytokines, tel le TNF $\alpha$ . [240] Ce dernier est donc relargué au cours des stades intermédiaires du développement de l'athérosclérose et exacerbe la réponse inflammatoire. À titre d'exemple, en se liant à son récepteur au niveau des CMLV il stimule le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B. Ceci y induit l'expression de la chimiokine MCP-1 ainsi que des protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 ce qui cause une recrudescence de l'infiltration monocyttaire dans l'intima. [241,242] Cela y provoque aussi l'expression et la libération des cytokines IL-6 et IL-8 qui agissent selon une signalisation autocrine ou paracrine afin d'induire la migration de ces cellules de la media à l'intima. [243] Toujours suivant l'activation de NF- $\kappa$ B dans les CMLV, le TNF $\alpha$  est également impliqué dans les étapes tardives de l'athérosclérose puisqu'il est à l'origine de la production et du relargage de MMPs par ces cellules. [244,245] Les MMPs sont impliquées dans la déstabilisation de la plaque athéromateuse via la destruction de la matrice extracellulaire. [244] À noter que les conséquences néfastes de cette cytokine dans le développement de l'athérosclérose vont bien au-delà de ses

effets sur les CMLV tel qu'élaboré dans la revue de Kleinbongard P., Heusch G. et Shulz R. [246]

Plusieurs évidences démontrent que les antagonistes du TNF $\alpha$  ont des effets bénéfiques sur la prévention de la progression de l'athérosclérose. [247] Par contre, les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traités avec des anticorps anti-TNF $\alpha$  sont enclins à des risques accrus d'infections graves et de développement de tumeurs malignes. [248] Ainsi, des cibles thérapeutiques plus spécifiques sont à déterminer. En ce qui concerne le TNF $\alpha$  et l'athérosclérose, quelques cibles potentielles ont été révélées par la biologie moléculaire, dont l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B, l'activité phosphotransférase d'IKK $\beta$  et de TAK1, l'activité catalytique des E3 ligases et l'interaction des cIAPs à RIP1.

#### 4.2.4.2 IL-1 $\beta$

Le récepteur IL1 R1 s'associe aux protéines IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) suivant la liaison de la cytokine IL-1 $\beta$  à ce dernier. Cette association induit le recrutement de la protéine adaptatrice myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88) qui résulte au recrutement de la kinase IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-1 et de la protéine adaptatrice Tollip. Puisque IRAK-1 contient trois motifs d'interaction pour la E3 ligase TRAF6, il permet l'oligomérisation de plusieurs de ces protéines au niveau du complexe multiprotéique formé au récepteur IL1 R1. Par contre, l'événement critique à cette voie de signalisation est le recrutement de la kinase IRAK-4 à ce dernier complexe. En effet, cette kinase phosphoryle IRAK-1 ce qui résulte en sa dissociation de MyD88 et de Tollip et ainsi en la libération au niveau du cytoplasme d'un complexe formé d'IRAK-1 et de TRAF6. (Figure. 17) [198] IRAK-1 y est dégradée tandis que TRAF6 y demeure oligomérisée, soit sous sa forme active. Cette E3 ligase au niveau du cytoplasme en conjonction avec la E2 Ubc13 s'auto-ubiquitine pour former des chaînes de poly-Ub en Lys63. TAB2 s'associe à ces dernières afin de stimuler le mécanisme d'autophosphorylation de TAK1. Le complexe IKK est également recruté à TRAF6 via IKK $\gamma$ . Ainsi, l'auto-ubiquitination de TRAF6 permet une proximité entre TAK1 et son substrat IKK $\beta$ . De plus, une fois



**Figure. 17 : Voie d'activation d'IKK $\beta$  dépendante de l'IL-1 $\beta$ .**

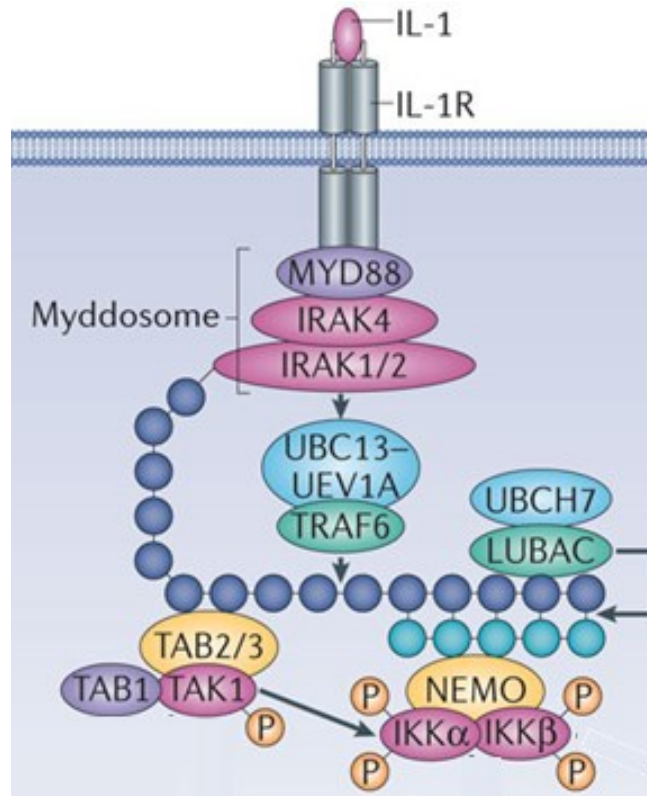
L'IL-1 $\beta$  est à l'origine de la dimérisation entre IL1 R1 et IL-1RAcP. Les protéines MyD88, IRAK-4 et IRAK-1/2 sont recrutées à ce dimère et forme ainsi le mydosome. La E3 ligase TRAF6 s'associe à ce complexe multiprotéique via sa liaison à IRAK-1. Ultiment, IRAK-4 phosphoryle IRAK-1 ce qui résulte à sa dissociation de MyD88 et ainsi à la libération du complexe IRAK-1/TRAF6. Dès lors, TRAF6 en conjonction avec la E2 Ubc13 permet la formation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63. TAB2 via son UBD s'associe à ces dernières ce qui résulte à l'activation de TAK1. De plus, ces chaînes occasionnent le recrutement du complexe IKK via l'UBD d'IKK $\gamma$  (NEMO). TAK1 active ce dernier complexe via la phosphorylation d'IKK $\beta$ . IKK $\beta$  phosphoryle par la suite I $\kappa$ B $\alpha$  ce qui induit sa poly-ubiquitination en Lys48 par le complexe SCF- $\beta$ TrCP et donc sa dégradation par le protéasome. NF- $\kappa$ B (p50/p65) est ainsi libéré de l'emprise de son inhibiteur et transloque au noyau afin d'induire divers gènes. *Chen ZJ (2012) Immunol Rev 246: 95-106.*



recruté à TRAF6, IKK $\gamma$  se voit lui-même poly-ubiquitiné par des chaînes en Lys63 par TRAF6 ce qui assure une stabilité d'association au niveau du complexe kinase/substrat. Bien que la poly-ubiquitination d'IKK $\gamma$  ne soit pas essentielle à l'activation du complexe, elle est à l'origine d'une activation vigoureuse d'IKK $\beta$ . [204] Par contre, cette cascade de signalisation très linéaire se complexifie plus elle est étudiée. En effet, il a récemment été démontré que l'activité E3 ligase de TRAF6 est bel et bien essentielle à l'activation de TAK1, mais que son auto-ubiquitination est facultative pour l'activation de la kinase. [249] Cette observation permis d'identifier une toute nouvelle caractéristique à cette E3 ligase, soit sa capacité à induire la formation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63. Ainsi, en réponse à l'IL-1 $\beta$ , toutes les composantes du modèle classique sont recrutées à IL-1R1 résultant en la libération du complexe IRAK-1/TRAF6 au cytoplasme. TRAF6 en conjonction avec la E2 Ubc13 permet la formation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63. (Figure. 17) TAB2 s'associe à ces dernières ce qui résulte en l'autophosphorylation de TAK1 et donc en son activation. De plus, ces chaînes occasionnent le recrutement du complexe IKK, et ce, via la sous-unité IKK $\gamma$ . [174] Ainsi, suite à l'activation du récepteur IL-1 R1, TAK1 peut aisément activer son substrat, puisque cette dernière et le complexe IKK sont recrutées au niveau d'un même microenvironnement, et ce, via leur association à des chaînes de poly-Ub libres en Lys63. [250]

Également, une seconde étude a démontré que suite à la liaison de l'IL-1 $\beta$  au récepteur IL1 R1, TRAF6 y est recrutée via IRAK-1 afin d'induire la formation de chaînes covalentes de poly-Ub en Lys63 au niveau de ce dernier. [251] La E3 ligase LUBAC s'associe à ces chaînes et y induit la synthèse de chaînes de poly-Ub linéaires (M1) ce qui résulte en la production de chaînes hybrides de poly-Ub. (Figure. 18) TAB2 est recruté aux chaînes de poly-Ub en Lys63 tandis qu'IKK $\gamma$  se lie aux chaînes linéaires dans le but que TAK1 soit à proximité d'IKK $\beta$  pour le phosphoryler et donc l'activer. [252]

Selon le Dr. Zhijian J. Chen, soit un expert dans le domaine de l'ubiquitination, aucun de ces modèles n'est à privilégier. En effet, il stipule que le mécanisme



**Figure. 18 : Complexification de la voie d'activation d'IKK $\beta$  dépendante de l'IL-1 $\beta$ .**

La liaison de l'IL-1 $\beta$  au récepteur IL1 R1 induit le recrutement de la protéine MyD88 ce qui permet le recrutement des protéines IRAK-4 et IRAK-1/2 afin de former le myddosome. Puisque IRAK-1 contient trois motifs d'interaction pour la E3 ligase TRAF6, il permet son oligomérisation et donc son activation. Dès lors, TRAF6 en conjonction avec la E2 Ubc13 induit la synthèse de chaînes de poly-Ub en Lys63 au niveau d'IRAK-1. La E3 ligase LUBAC s'associe à ces chaînes et induit en coordination avec la E2 Ubch7 la formation de chaînes de poly-Ub linéaires (M1) au niveau des chaînes de poly-Ub en Lys63. TAB2 via son UBD s'associe aux chaînes de poly-Ub en Lys63 ce qui résulte à l'activation de TAK1 tandis que les chaînes de poly-Ub linéaires (M1) occasionnent le recrutement du complexe IKK via l'UBD d'IKK $\gamma$  (NEMO). TAK1 active ce dernier complexe via la phosphorylation d'IKK $\beta$ . *Clark K, Nanda S, Cohen P (2013) Rev Mol Cell Biol 14: 673-685.*

d'activation du complexe IKK dépendant de l'ubiquitination suite à la liaison de l'IL1 $\beta$  à son récepteur, est plutôt représenté par un amalgame de tous ces événements et possiblement d'événements toujours inconnus. [Communication personnelle dans le cadre des conférenciers de prestige de l'Université de Montréal de la Faculté de Pharmacie/Rx&D, 21 octobre 2013]

#### 4.2.4.2.1 Pathologie associée à l'IL-1 $\beta$ : Accent sur l'athérosclérose

Plusieurs études démontrent l'importance de la cytokine IL-1 $\beta$  dans le développement de l'athérosclérose chez l'homme. En effet, cette cytokine est présente en plus grande concentration dans les artères coronaires atteintes par l'athérosclérose comparativement aux artères saines. [253] De plus, un taux sanguin élevé d'IL-1 $\beta$  est associé à la présence des facteurs de risque de cette maladie, tels l'hyperlipidémie, le tabagisme et l'hypertension. [254] Tout comme le TNF $\alpha$ , les macrophages sont l'une des premières sources d'IL-1 $\beta$  au niveau de la lésion vasculaire, elle participe donc aux stades intermédiaires de l'athérosclérose. [255]

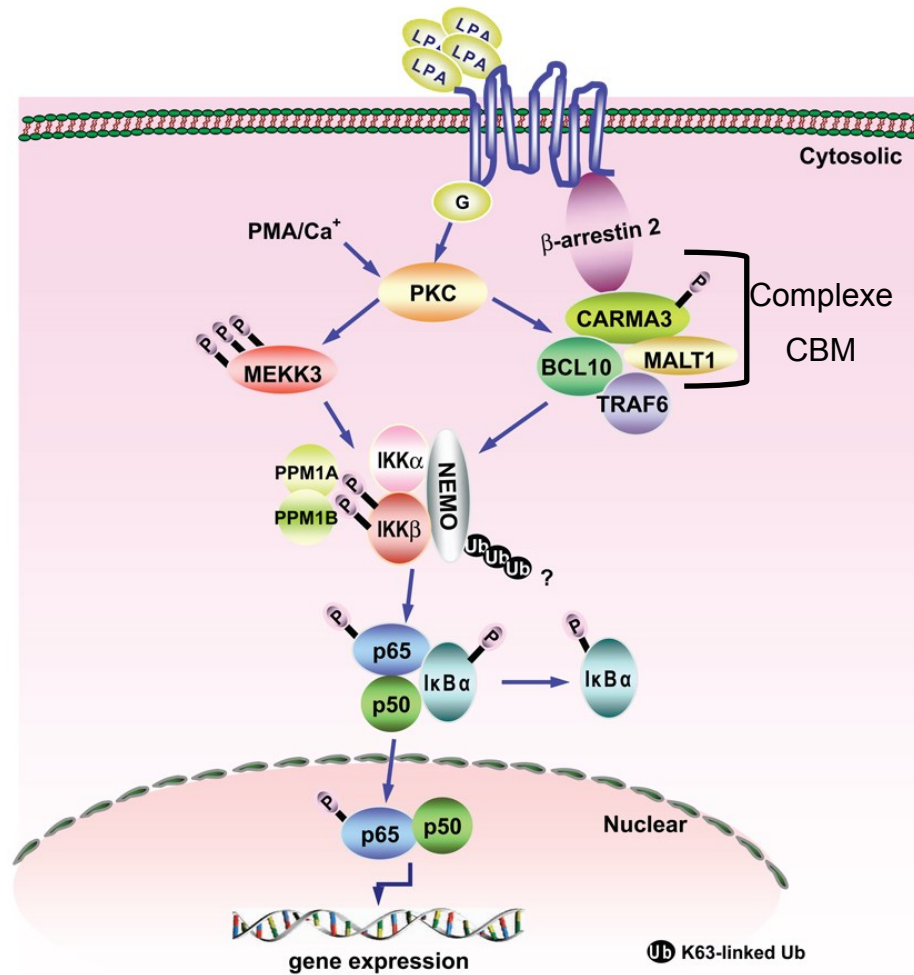
La contribution de cette cytokine dans l'évolution de l'athérosclérose est non négligeable tel que discuter dans la revue de von der Thusen, J.H., *et al.* [256] Elle est attribuée en partie à la capacité de l'IL-1 $\beta$  à activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B au sein de différents types cellulaires. [256] En effet, l'activation de NF- $\kappa$ B induit, entre autres, l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que la synthèse et la libération des cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales et les CMLV, soit des événements responsables respectivement de la migration des monocytes et des CMLV dans l'intima des artères. [256]

Le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  induisent des réponses inflammatoires de même nature et régulent réciproquement leur production. Elles contribuent donc à l'établissement de l'inflammation incontrôlée lors du développement de l'athérosclérose. [257] À l'instar du TNF $\alpha$ , des antagonistes de l'IL-1 $\beta$  sont disponibles sur le marché pour traiter certaines maladies inflammatoires, telle la polyarthrite rhumatoïde. [258] Cependant, des études chez la souris démontrent que l'absence du récepteur IL1 R1 augmente le risque de rupture des plaques athéromateuses. [259] Ainsi, dépendamment du stade de développement de la pathologie, la signalisation induite par les cytokines IL-1 est

nuisible ou protectrice. Il est donc nécessaire de définir des cibles thérapeutiques plus spécifiques que le récepteur ou l'agoniste lui-même. De plus, puisque l'évolution de l'athérosclérose fait intervenir plusieurs cytokines, le développement de molécules visant leurs effecteurs intracellulaires communs est opportun, tels NF- $\kappa$ B, IKK $\beta$  et TAK1 en ce qui concerne le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ .

#### **4.2.4.3 LPA**

Le LPA est un dérivé phospholipidique bioactif. Il régule plusieurs réponses cellulaires, telles la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la synthèse et la libération de cytokines, et ce, par l'activation de divers facteurs de transcription, dont NF- $\kappa$ B. [218] Le LPA est un agoniste de plus de cinq différents RCPG, dont les récepteurs LPA1 à LPA5 qui sont codés par des gènes distincts. [260] Suivant sa liaison à l'un des ses récepteurs, le LPA induit notamment l'activation de la protéine G $\alpha$ q. Ceci conduit, en premier lieu, à l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et à la production de DAG, soit deux événements essentiels à l'activation de la protéine kinase PKC $\alpha$ . En second lieu, il y a successivement recrutement de la protéine  $\beta$ -arrestine 2 au niveau du récepteur et recrutement d'une protéine nommée caspase recruitment domain family (CARMA) au niveau de  $\beta$ -arrestine 2. [261] (Figure. 19) Les protéines CARMA sont des molécules agissant en tant que protéines d'échafaudage. Ces dernières sont hautement homologues au niveau de leur séquence en acides aminés ainsi qu'au niveau de leur structure et sont toutes trois essentielles à l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse à des agonistes donnés. Par contre, leur profil d'expression diffère : CARMA1 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques, CARMA2 dans le placenta et CARMA3 dans les cellules non-hématopoïétiques. [262] Au niveau de ce dernier type cellulaire, c'est donc CARMA3 qui est recrutée lorsque le LPA active son RCPG. Suivant son association à  $\beta$ -arrestine 2, CARMA3 est phosphorylée par la PKC $\alpha$ . [261] Cette phosphorylation induit le recrutement des protéines B-Cell CLL/Lymphoma 10 (BCL10) et mucosa-associated lymphoid tissue (MALT1) à CARMA3 ce qui engendre la formation d'un complexe multiprotéique nommé CBM. (Figure. 19) [218] Puisque MALT1 contient



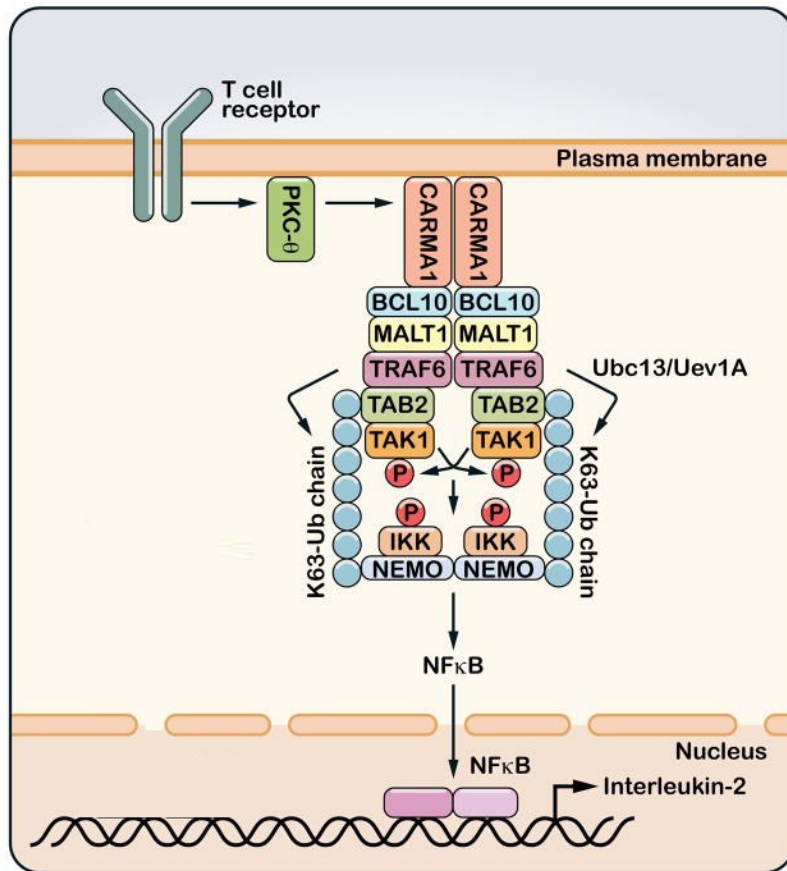
**Figure. 19 Voie d'activation d'IKK $\beta$  dépendante du LPA.**

En réponse au LPA, les protéines  $\beta$ -arrestine 2 et CARMA3 sont recrutées à son RCPG. Les kinases PKC $\alpha$  et MEKK3 sont également activées. La PKC $\alpha$  phosphoryle CARMA3 pour y induire le recrutement de BCL10 et de MALT1 ce qui forme ainsi le complexe CBM. Ce dernier est à l'origine du recrutement et de l'auto-activation de la E3 ligase TRAF6. Le complexe IKK est activé si deux modifications post-traductionnelles indépendantes s'y opèrent, soit la phosphorylation d'IKK $\beta$  par MEKK3 et la poly-ubiquitination en Lys63 d'IKK $\gamma$  (NEMO) par la E3 ligase TRAF6. IKK $\beta$  phosphoryle par la suite I $\kappa$ B $\alpha$  ce qui induit sa dissociation de NF- $\kappa$ B (p50/p65). Ce dernier est ainsi libéré de l'emprise de son inhibiteur et transloque au noyau afin d'induire divers gènes. *Sun W, Yang J (2010) Cell Signal 22: 1799-1803.*

trois sites de liaisons pour TRAF6, il y a formation d'un oligomère TRAF6 au niveau du complexe CBM. TRAF6 peut ainsi s'auto-ubiquitiner et ubiquitiner MALT1 via la formation de chaînes de poly-Ub en Lys63. La liaison de la sous-unité IKK $\gamma$  à ces chaînes induit le recrutement du complexe IKK au récepteur. La sous-unité structurale du complexe IKK est par la suite elle-même un substrat pour TRAF6. À l'opposé des voies engendrées par l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ , la phosphorylation d'IKK $\beta$  induite par le LPA est indépendante de l'ubiquitination. En effet, MEKK3 phosphoryle IKK $\beta$  sans l'apport de ce dernier mécanisme. [209] Également, bien que les récepteurs des cellules T et des cellules B induisent aussi la formation du complexe CBM, la phosphorylation d'IKK $\beta$  est dépendante de l'ubiquitination contrairement au récepteur du LPA. En effet, cette dernière modification post-traductionnelle dans les cellules immunitaires est à l'origine de l'activation de TAK1 et de la proximité entre cette kinase et IKK $\beta$ . (Figure. 20) [198] Ainsi, le LPA est le seul ligand énoncé dont la phosphorylation d'IKK $\beta$  est distincte de l'ubiquitination.

#### *4.2.4.3.1 Pathologie associée au LPA : Accent sur l'athérosclérose*

Le LPA a été associé au développement de l'athérosclérose notamment lorsqu'une équipe de recherche a démontré que ce dérivé phospholipidique bioactif est produit lors de l'oxydation des LDL et qu'il s'accumule en forte concentration au sein des lésions athérosclérotiques. [263] Ainsi, contrairement à la majorité des cytokines, tels le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , le LPA est présent au cours des événements précoces caractérisant le développement de l'athérosclérose. À ce stade, sa fonction délétère repose sur sa capacité à induire l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Le LPA participe donc au recrutement et à l'infiltration des premiers monocytes dans l'intima des artères où ces derniers se différencient en macrophages. Le LPA participe également aux étapes intermédiaires du développement de l'athérosclérose en établissant un environnement inflammatoire à la lésion vasculaire. [264] En effet, la liaison du LPA aux macrophages induit l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui engendre notamment la production et la libération des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . En outre, ce



**Figure. 20 : Voie d'activation d'IKK $\beta$  dépendante du TCR.**

Le TCR est à l'origine de l'activation de la PKC $\theta$ . Cette dernière phosphoryle ensuite la protéine CARMA1 qui recrute alors BCL10 et MALT1. La formation du complexe CBM induit le recrutement et l'activation de la E3 ligase TRAF6. Cette dernière catalyse alors des chaînes de poly-Ub en Lys63 afin de recruter TAK1 et le complexe IKK via respectivement TAB2 et IKK $\gamma$  (NEMO). TAK1 s'autophosphoryle et phosphoryle par la suite le complexe IKK via la phosphorylation d'IKK $\beta$ . Le complexe IKK induit la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau où il y induit des gènes spécifiques. *Chen ZJ (2012) Immunol Rev 246: 95-106.*

phospholipide induit la production et la libération d'IL-6 et de MCP-1 par les CMLV afin d'intensifier respectivement le recrutement des CMLV et des monocytes dans l'intima. [265] Ainsi, le LPA est impliqué au cours des stades précoces et intermédiaires du développement de l'athérosclérose via, en particulier, l'activation du complexe IKK et conséquemment l'activation de NF- $\kappa$ B au niveau des diverses cellules retrouvées à la lésion vasculaire.

Les voies de signalisation inflammatoires induites par le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPA sont distinctes, mais convergent à l'activation d'IKK $\beta$ . Puisque le LPA est à l'origine de la production du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , IKK $\beta$  est une cible thérapeutique potentielle lors de l'inflammation associée au développement de l'athérosclérose.

### **4.3 Substrats d'IKK $\beta$**

Le premier substrat attribué à la kinase IKK $\beta$  est I $\kappa$ B $\alpha$ . [181] Par contre, IKK $\beta$  est associée à un site consensus retrouvé au sein d'autres protéines, soit DSG $\Psi$ XXS/T, où D indique un résidu acide aspartique, S un résidu sérine, G un résidu glycine,  $\Psi$  un résidu hydrophobe, X n'importe quel résidu, et T un résidu thréonine. [266] Ainsi, IKK $\beta$  exerce son activité phosphotransférase envers plusieurs autres substrats. Notamment, cette kinase peut directement activer NF- $\kappa$ B via la phosphorylation de la sous-unité p65, peut stimuler la prolifération cellulaire via la phosphorylation du suppresseur de tumeur Forkhead Box Protein O3, peut diminuer l'activité des MAPK via la phosphorylation de la protéine adaptatrice docking protein 1, peut phosphoryler le récepteur insulino-récepteur substrate-1 afin d'inhiber la signalisation cellulaire induite par l'insuline et peut activer la protéine mTOR afin d'induire la synthèse protéique. [190,267]

#### **4.3.1 mTOR**

Au cours des années 1980, une molécule inhibant la prolifération de la bactérie *Streptomyces Hygroscopicus* fut identifiée, soit la rapamycine. La cible de cette dernière fut déterminée au début des années 1990, à savoir mTOR. Elle est une sérine/thréonine kinase atypique qui s'associe à diverses protéines afin de former deux complexes distincts, soit mTOR complex (mTORC)-1 et mTORC2. La disparité



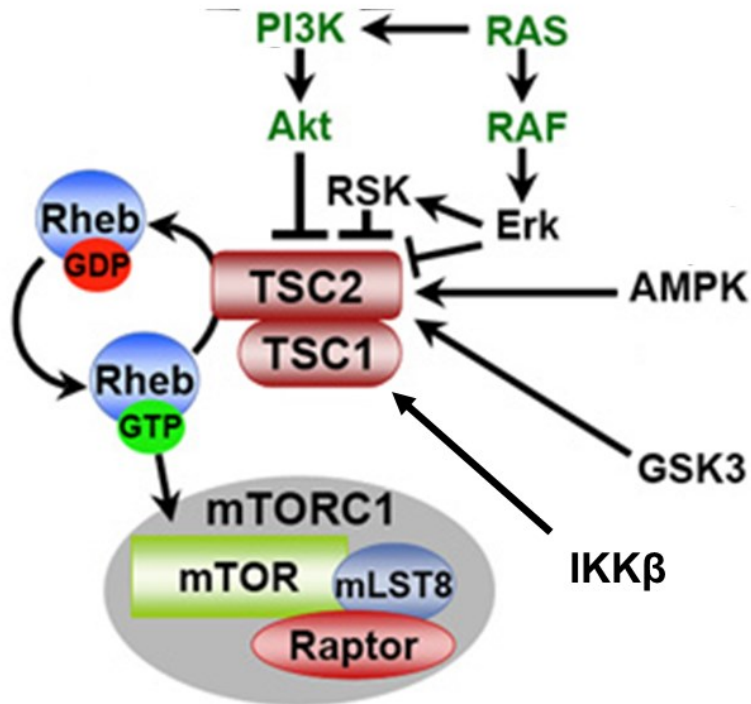
au niveau de leur fonction dépend des protéines avec lesquelles mTOR interagit. Les protéines regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin (Raptor) et mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8) sont parmi les protéines s'associant à mTOR afin de former le complexe mTORC1 tandis que les protéines rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor), mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1 et protein observed with rictor 1 and 2 sont parmi celles s'associant à mTOR pour constituer le complexe mTORC2. mTORC1 est le seul complexe sensible à la rapamycine et est un régulateur majeur de la synthèse protéique. [268]

#### **4.3.1.2 TSC1/TSC2**

L'hétérodimère formée des protéines tuberous sclerosis 1 (TSC1; hamartin) et TSC2 (tuberin) régule l'activité de mTORC1. TSC1 est une sous-unité structurale qui prévient la dégradation de TSC2 par le protéasome. TSC2 agit en tant que GTPase-activating protein (GAP) pour la GTPase Ras homolog enriched in brain (Rheb). Rheb stimule l'activité catalytique de mTORC1 seulement lorsqu'il est associé à une molécule de GTP. (Figure. 21) Ainsi, en tant que GAP vis-à-vis Rheb, TSC2 régule négativement mTORC1 en convertissant le complexe GTP- Rheb en GDP-Rheb. Les kinases AKT, ERK1/2 et ribosomal S6 kinase (RSK) sont impliquées dans l'activation de mTORC1 puisqu'elles phosphorylent TSC2 et l'inactivent. (Figure. 21) [269] IKK $\beta$  est également impliquée dans l'activation de mTORC1 puisqu'il phosphoryle TSC1 et cause ainsi sa dissociation de TSC2. [268]

#### **4.3.1.3 4EBP1 et S6K**

La fonction la plus caractérisée associée à mTORC1 est la synthèse protéique. Les cibles du complexe sont les protéines translational regulators eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1) et S6 kinase 1 (S6K1). En condition basale 4E-BP1 séquestre la protéine eIF4E, soit un facteur essentiel à la traduction cap-dépendante. La phosphorylation de 4E-BP1 par mTORC1 inhibe cette association et permet à eIF4E de s'associer à la protéine eIF4G afin d'initier la traduction. [268] Bien que eIF4E soit régulée positivement par



**Figure. 21: Régulation de l'activité de mTORC1.**

Le point de convergence des agonistes régulant l'activation de mTORC1 est le complexe TSC1/TSC2. TSC2 inhibe mTORC1 par son activité GAP envers Rheb et cette activité est abrogée suivant la phosphorylation de TSC2 par AKT, ERK et RSK tandis qu'elle est activée suivant la phosphorylation de TSC2 par GSK3 et AMPK ainsi que la phosphorylation de TSC1 par IKK $\beta$ . Ainsi, AKT, ERK, RSK et IKK $\beta$  activent mTORC1 tandis que GSK3 et AMPK l'inhibent. *Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, et al. (2010) Mol Cell 39: 171-183.*

d'autres mécanismes, tel que discuté dans la revue de Diab S., *et al.*, l'activation de mTORC1 est l'étape limitante à la synthèse protéique qui dépend de cet effecteur. [270] Quant à la protéine S6K1 la phosphorylation de cette dernière par mTORC1 induit son activité catalytique. [271] Une fois active, elle phosphoryle la protéine ribosomique S6 afin de faciliter le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome particulièrement aux acides ribonucléiques messagers (ARNm) composés d'une séquence d'oligopyrimidines à leur extrémité 5' terminale (5'TOP). Ces derniers codent pour les protéines ribosomiques, les facteurs d'élongation et quelques autres effecteurs régulant la traduction. [272] L'activation de la protéine S6K accroît donc la biogenèse des ribosomes, le taux d'initiation de la traduction et l'efficacité du mécanisme d'élongation des chaînes protéiques. [271]

#### **4.3.1.4 Pathologie associée à mTOR : Accent sur l'athérosclérose**

Une dérégulation de l'activité de mTORC1 est associée à de nombreuses pathologies, dont le diabète, l'obésité, le cancer et l'Alzheimer. Par contre, la détermination des effecteurs à l'origine de la suractivation de mTORC1 n'est encore qu'à ses débuts. [271] Au niveau des maladies cardiovasculaires, mTORC1 est déjà une cible thérapeutique. En effet, des inhibiteurs analogues à la rapamycine peuvent enduire les mailles métalliques de l'endoprothèse implantée dans les artères lors d'une angioplastie afin de prévenir le processus de resténose. Également, l'administration de ces inhibiteurs par voie sous-cutanée atténue la progression de l'athérosclérose et assure une meilleure stabilité des plaques athéromateuses chez de nombreux modèles animaux. [273] Par contre, les mécanismes intracellulaires couplant l'activation de mTORC1 au développement de l'athérosclérose sont peu connus. Cette pathologie est occasionnée par un remodelage vasculaire dépendant, entre autres, de la croissance et de la réponse inflammatoire des CMLV. L'un des principaux effecteurs de la réponse inflammatoire est IKK $\beta$ . Par ailleurs, il a été démontré qu'en réponse au TNF $\alpha$  cette même kinase a également la capacité de contrôler les mécanismes d'initiation de la traduction, via sa capacité à activer mTORC1 dans les cellules cancéreuses. [266] Ainsi, IKK $\beta$  est potentiellement l'un

des effecteurs couplant l'activation de mTORC1 à l'athérosclérose au niveau de la croissance des CMLV.

## Chapitre 2 : Hypothèses et Objectifs

### 1.0 Hypothèses

Le principal peptide bioactif du SRAA, soit l'Ang II, fut en premier lieu décrit en tant qu'hormone impliquée dans la vasoconstriction des CMLV, dans la libération d'aldostérone et dans la réabsorption du sodium. Mais cette vision classique de l'Ang II fut revisitée au cours des années 1990. En effet, l'Ang II est maintenant définie en tant que cytokine pro-inflammatoire et facteur de croissance. [274] En agissant comme tel au niveau des cellules de la vasculature, l'Ang II est à l'origine notamment de leur inflammation, de leur croissance, de leur migration et de leur capacité à produire des ROS, soit des événements impliqués dans le remodelage vasculaire caractéristique de certaines maladies cardiovasculaires, dont l'hypertension et l'athérosclérose.

Les CMLV sont des cellules clés au cours du remodelage vasculaire. L'Ang II agit en tant que cytokine pro-inflammatoire sur ces dernières en y favorisant l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 ainsi qu'en y stimulant la production et la libération de diverses chimiokines, dont MCP-1 et IL-8. L'Ang II agit également en tant que facteur de croissance pour les CMLV et induit ainsi leur dédifférenciation en cellules synthétiques, leur migration, leur hypertrophie et leur hyperplasie. [274] L'Ang II a donc la capacité de moduler la réponse phénotypique des CMLV.

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire et l'inflammation va de pair avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Ainsi, plusieurs chercheurs ont abordé l'importance de ce facteur de transcription dans le développement de cette pathologie. Ils concluent de leurs études que NF- $\kappa$ B est l'effecteur capital orchestrant l'inflammation associée à l'athérosclérose. [275] En conjonction à ces découvertes, il a été démontré que NF- $\kappa$ B est activé dans les CMLV retrouvées à la lésion vasculaire et que les effets inflammatoires induits par l'Ang II dans ces cellules sont dépendants en

partie de son activation, plus particulièrement de l'hétérodimère p50/p65. [194,276,277] Par la suite, il fut déterminé que l'activation de ce facteur de transcription au niveau des CMLV exposées à l'Ang II dépend de l'activation de la sous-unité catalytique IKK $\beta$  du complexe IKK. [193] À noter que, l'implication pathologique de l'activation d'IKK $\beta$  par l'Ang II n'est pas restreinte à l'athérosclérose puisque tel que discuté dans la revue de Li X. C. et Zhuo J. L., une telle signalisation s'opère également au cours de l'hypertension essentielle et contribue ainsi aux dommages des organes cibles, soit le cœur, le rein, l'œil et le cerveau. [278]

La voie de signalisation couplant l'axe AngII/AT1 au complexe p50/p65 est dite non canonique puisque IKK $\beta$  en réponse à l'octapeptide n'induit pas la phosphorylation de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$ , mais plutôt la phosphorylation de la sous-unité p65 pour l'activation de ce facteur de transcription. [193] D'autres part, des études d'inactivation génique ont démontré que la plupart des stimuli activant NF-kB convergent à l'activation du complexe IKK, dont le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPA. [198,218,279] Les voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans l'activation d'IKK $\beta$  par ces derniers sont considérablement caractérisées tandis que les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation d'IKK $\beta$  au niveau des CMLV en réponse à l'Ang II sont énigmatiques. Les recherches entourant les voies de signalisation initiées notamment par le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPA ont permis d'identifier deux IKK kinases, soit MEKK3 et TAK1. En réponse à ces mêmes agonistes, l'ubiquitination est une seconde modification post-traductionnelle essentielle à l'activation d'IKK $\beta$ . Ce mécanisme est dépendant notamment de la E3 ligase TRAF6. L'hypothèse subséquente fut alors posée. **Hypothèse 1: L'activation d'IKK $\beta$  au niveau des CMLV exposées à l'Ang II dépend des kinases MEKK3 et/ou TAK1 ainsi que de la E3 ligase TRAF6.**

En plus de l'inflammation, le remodelage vasculaire est en partie caractérisé par l'hypertrophie cellulaire. L'Ang II en tant que facteur de croissance à la capacité d'induire ce phénomène au niveau des CMLV. L'hypertrophie est la résultante d'une importante élévation du taux de synthèse protéique au sein de la cellule. Des protéines couplant l'axe Ang II/AT1 à la synthèse protéique au sein des CMLV ont déjà été identifiées, mais les voies de signalisation participant à ce phénomène ne

sont pas complètement élucidées. Or, il a été démontré que le principal effecteur de la réponse inflammatoire associée au remodelage vasculaire, soit IKK $\beta$ , a la capacité de contrôler les mécanismes d'initiation de la traduction via son aptitude à activer la protéine mTORC1 en réponse au TNF $\alpha$  dans les cellules cancéreuses. [266] L'hypothèse suivante fut donc émise. **Hypothèse 2 : L'activation d'IKK $\beta$  par l'Ang II est non seulement impliquée dans la réponse inflammatoire des CMLV, mais également au niveau de leur réponse hypertrophique.**

## 2.0 Objectifs

Afin de répondre à ces hypothèses, deux objectifs principaux ont été énoncés.

### 2.1 Objectif 1

Caractériser les processus moléculaires à l'origine de l'activation de la sous-unité catalytique IKK $\beta$  au niveau des CMLV exposées à l'Ang II.

#### 2.1.1 Rationnelle et sommaire des résultats

Cette étude découle d'une observation inattendue, soit que la phosphorylation d'IKK $\beta$  dans les CMLV exposées à l'Ang II survient aussi rapidement que quinze secondes. Ceci suggéra un rôle des seconds messagers pour l'activation du complexe IKK. En conjonction à cette observation, de nombreuses études démontrent l'importance des PKC conventionnelles pour l'activation de NF- $\kappa$ B par l'Ang II. [280,281] Ainsi, bien que la première hypothèse questionne la fonction des protéines MEKK3, TAK1 et TRAF6 envers IKK $\beta$ , le premier sous-objectif fut plutôt de déterminer si la phosphorylation/activation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II dans les CMLV est dépendante de l'augmentation de calcium et de la production de DAG, soit deux seconds messenger essentiels à l'activation des PKC conventionnelles. De là, le premier effecteur impliqué dans la phosphorylation/activation d'IKK $\beta$  et par conséquent dans l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B en réponse à l'Ang II fut identifié, soit PKC $\alpha$ . Ce résultat, en complément à la littérature, permit la découverte d'autres effecteurs impliqués dans la phosphorylation/activation d'IKK $\beta$  au

niveau des CMLV exposée à l'Ang II. En effet, plusieurs données présentées dans des revues scientifiques démontrent que l'engagement des récepteurs des cellules B et des cellules T causent respectivement l'activation des protéines PKC $\beta$  et PKC $\theta$  afin d'induire l'activation de TRAF6 et subséquemment l'activation de TAK1 et du complexe IKK. [282,283] Également, en réponse au LPA, un agoniste d'un RCPG tout comme l'Ang II, la kinase PKC $\alpha$  est impliquée au niveau de l'activation de TRAF6 et de MEKK3. Celles-ci agissent de concert mais selon des mécanismes distincts afin d'activer le complexe IKK. [209] Les molécules citées au niveau de l'hypothèse de départ sont donc toutes sous la gouverne des PKC. Le second sous-objectif fut alors de déterminer si la phosphorylation/activation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II est dépendante de TRAF6 ainsi que de TAK1 et/ou de MEKK3, suite à l'activation de PKC $\alpha$ . Les résultats obtenus démontrent que TAK1, et non MEKK3, est impliquée dans l'activation du complexe IKK et que TRAF6 est essentielle à l'activation de cette kinase. Or, TAK1 est une protéine importante, mais dispensable pour la phosphorylation/activation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II. En effet, en son absence la phosphorylation de la sous-unité IKK $\beta$  est complètement abrogée en deçà de cinq minutes, mais n'est pas affectée au-delà. Par contre, l'implication cruciale de TAK1 pour une activation efficace du complexe IKK est démontrée par le fait qu'en son absence l'activité phosphotransférase d'IKK $\beta$  diminue de 50%. Par ailleurs, l'étonnante observation de la phosphorylation tardive permet d'identifier d'autres protéines impliquées dans la phosphorylation/activation d'IKK $\beta$  qui ne sont pas mentionnées au niveau de l'hypothèse. En effet, la phosphorylation retardée d'IKK $\beta$  parallèle la phosphorylation d'ERK1/2. L'objectif suivant fut donc de déterminer si la voie MEK1/2-ERK1/2-RSK était responsable de la phosphorylation tardive d'IKK $\beta$ . Cette supposition s'avéra exacte. Ainsi, IKK $\beta$  est activée par l'Ang II dans les CMLV par deux voies de signalisation indépendantes, mais complémentaires pour une activation vigoureuse et soutenue du complexe IKK. L'une intervient dans les quinze secondes et correspond à l'axe Ang II-AT1-TRAF6-TAK1-IKK ; la seconde intervient à partir de cinq minutes et correspond à l'axe Ang II-AT1-MEK1/2-ERK1/2-RSK-IKK. Ces deux voies se doivent d'être fonctionnelles pour que la réponse inflammatoire



dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B par l'Ang II soit efficace. Elles correspondent à des voies non-canoniques d'activation de NF- $\kappa$ B.

Ainsi, cette étude permet de proposer un modèle moléculaire pour la réponse inflammatoire des CMLV en réponse à l'Ang II. Ce modèle est présenté dans l'article: Doyon P, Servant MJ (2010) Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal S6 kinase intracellular pathways link the angiotensin II AT1 receptor to the phosphorylation and activation of the I $\kappa$ B kinase complex in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 285: 30708-30718. [180]

## **2.2 Objectif 2**

Déterminer la fonction de la sous-unité catalytique IKK $\beta$  au niveau des effets hypertrophiques dépendant de l'Ang II *in vitro* et *in Vivo*.

### **2.2.1 Rationnelle et sommaire des résultats**

Cette étude découle de trois aspects, soit que le remodelage vasculaire associé à l'Ang II au niveau des artères implique, entre autres, l'inflammation et l'hypertrophie des CMLV ; que la réponse inflammatoire est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B par IKK $\beta$  ; et que les recherches de Lee *et al.*, démontrent qu'IKK $\beta$  est impliquée dans les mécanismes d'initiation de la traduction en réponse au TNF $\alpha$ . [180,266] Ainsi, la seconde hypothèse prend toute son importance du fait que, si IKK $\beta$  s'avère bel et bien impliquée dans les mécanismes d'initiation de la traduction suivant son activation par l'Ang II, son inhibition diminuerait deux événements à l'origine du remodelage vasculaire, soit l'inflammation et l'hypertrophie. Lee *et al.*, ont démontré qu'en réponse au TNF $\alpha$ , IKK $\beta$  active mTORC1 via la phosphorylation de TSC1 sur son résidu sérine 511. Notre premier sous-objectif fut donc de vérifier si l'Ang II dans des CMLV en culture avait la capacité d'induire la phosphorylation de TSC1 en sérine 511. L'Ang II induit cette phosphorylation qui parallèle la phosphorylation des protéines impliquées dans la synthèse protéique, soit mTOR, S6K et 4EBP1. Ainsi, le second sous-objectif fut de vérifier si IKK $\beta$  est impliquée au niveau de la phosphorylation de ces protéines. En réponse à l'Ang II, IKK $\beta$  est bel et bien une kinase en amont de TSC1 et des effecteurs de la synthèse

protéique dépendant de l'activation de mTORC1. Qui plus est, des essais de synthèse protéique démontrent que TSC1 en réponse à l'Ang II induit l'hypertrophie des CMLV en culture dépendamment d'IKK $\beta$ . Ainsi, *in vitro* l'hypertrophie des CMLV exposées à l'Ang II dépend en partie de l'axe Ang II-AT1-IKK $\beta$ -TSC1-mTORC1. Des études *in vivo* ont eu lieu par la suite afin de déterminer si l'inhibition d'IKK $\beta$  diminue les processus inflammatoires et hypertrophiques dépendants de l'Ang II. Les rats exposés à l'Ang II, où l'activité d'IKK $\beta$  est inhibée, démontrent une diminution de l'inflammation et de la synthèse protéique au niveau de l'aorte et des artères mésentériques. Ainsi, IKK $\beta$  semble être une cible thérapeutique potentielle pour la diminution du remodelage vasculaire caractéristique de l'athérosclérose.

Cette étude permet de proposer un modèle moléculaire où les réponses inflammatoires et hypertrophiques des CMLV en réponse à l'Ang II sont toutes deux dépendantes de la sous-unité catalytique IKK $\beta$ . Ce modèle est présenté dans l'article: Doyon P, van Zuylen WJ, Servant MJ (2013) Role of I $\kappa$ B kinase- $\beta$  in the growth-promoting effects of angiotensin II *In Vitro* and *In Vivo*. [284]

## **Chapitre 3 : Résultats**

### **1.0 The Journal of Biological Chemistry**

**Journal:** The Journal of Biological Chemistry

**Article accepté**

**Parution:** 1 octobre 2010

**Facteur d'impact 2010:** 5.328

**Titre:** Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal S6 kinase intracellular pathways link the angiotensin II AT1 receptor to the phosphorylation and activation of the I $\kappa$ B kinase complex in vascular smooth muscle cells.

**Auteur:** Priscilla Doyon, Marc J. Servant

**Directeur de recherche:** Marc J. Servant

**Apport:**

Totalité du travail.

**TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF) RECEPTOR-ASSOCIATED FACTOR-6  
(TRAF6) AND RIBOSOMAL S6 KINASE (RSK) INTRACELLULAR PATHWAYS  
LINK THE ANGIOTENSIN II AT1 RECEPTOR TO THE PHOSPHORYLATION AND  
ACTIVATION OF THE I $\kappa$ B KINASE (IKK) COMPLEX IN VASCULAR SMOOTH  
MUSCLES CELLS**

Priscilla Doyon<sup>1</sup> and Marc J Servant<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, H3C 3J7, Canada

Running head: TRAF6 and RSK pathways link the AT1R to the IKK complex

\*Corresponding author. Mailing Address: Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, Tel. 514 343-7966; Fax. 514 343-7073

**Summary**

**Activation of NF- $\kappa$ B transcription factors by locally produced angiotensin II (Ang II) is proposed to be involved in chronic inflammatory reactions leading to atherosclerosis development. However, a clear understanding of the signaling cascades coupling the Ang II AT1 receptors to the activation of NF- $\kappa$ B transcription factors is still lacking. Using primary cultured aortic vascular smooth muscle cells (VSMC), we show that activation of the IKK complex and NF- $\kappa$ B transcription factors by Ang II is regulated by the phosphorylation of the catalytic subunit I $\kappa$ B $\beta$  on serine residues 177 and 181 in the activation T-loop.**

The use of pharmacological inhibitors against conventional protein kinases C (PKCs), mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase (MEK)1/2, Ribosomal S6 Kinase (RSK), and silencing RNA technology targeting PKC $\alpha$ , IKK $\beta$  subunit, Tumor Growth Factor (TGF) $\beta$  Activating Kinase-1 (TAK1), the E3 ubiquitin ligase Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-Associated Factor-6 (TRAF6) and RSK isoforms, demonstrates the requirement of two distinct signaling pathways for the phosphorylation of IKK $\beta$  and the activation of the IKK complex by Ang II. Rapid phosphorylation of IKK $\beta$  requires a second messenger-dependent pathway composed of PKC $\alpha$ -TRAF6-TAK1, whereas sustained phosphorylation and activation of IKK $\beta$  requires the MEK1/2-ERK1/2-RSK pathway. Importantly, simultaneously targeting components of these two pathways completely blunts the phosphorylation of IKK $\beta$  and the proinflammatory effect of the octapeptide. This is the first report demonstrating activation of TAK1 by the AT1R. We propose a model whereby TRAF6-TAK1 and ERK-RSK intracellular pathways independently and sequentially converge to the T-loop phosphorylation for full activation of IKK $\beta$ , which is an essential step in the proinflammatory activity of Ang II.

**Key Words (5):** TAK1, TRAF6, Angiotensin II, IKK complex, Inflammation

## **Introduction**

The hormone angiotensin II (Ang II) is the effector of the circulating Renin Angiotensin System (RAS). Through binding of the Ang II receptor subtype 1 (AT1R), Ang II controls salt-water and blood pressure homeostasis (1). Components of the RAS are also found within several tissues where locally produced Ang II acts as a cytokine, modulating cellular responses in paracrine and autocrine fashions(2). Tissue RAS also contributes to homeostatic responses. However, deregulated and chronic production of tissue Ang II may be an important mechanism linking uncontrolled activation of local RAS to cardiovascular diseases (3,4). Regardless of the synthesis pathway, numerous studies have clearly established the effects of Ang II on vascular remodeling events such as atherosclerosis and hypertrophy, which are

mediated in part by the growth and inflammatory properties of the octapeptide on vascular smooth muscle cells (VSMC) (5-8). As such, we previously demonstrated that the hypertrophic property of Ang II in VSMC is largely dependent on the MEK-ERK signaling cascade and the incapacity of the octapeptide to downregulate the cell cycle inhibitor p27Kip1 (7,8). Another important signaling pathway that is often involved in chronic inflammatory diseases is the NF- $\kappa$ B pathway (see (9-13) for reviews). Indeed, aberrant NF- $\kappa$ B regulation has been described in human atherosclerotic plaques (14,15) and a recent mouse model of atherosclerosis in which NF- $\kappa$ B activation was blunted specifically in endothelial cells by genetic means highlighted the key role of the latter as a crucial promoter of atherosclerosis development (16). This observation possibly highlights that many processes affecting the formation of atherosclerotic plaques converge to the activation of NF- $\kappa$ B transcription factors (15)

The NF- $\kappa$ B family is represented by five members: p50, p65(RelA), c-Rel, p52, and RelB. In resting cells, they exist as homo- or heterodimers that are sequestered in the cytoplasm in an inactive form through their association with one of several inhibitory molecules, namely I $\kappa$ B, p105, and p100. In the classical pathway, the first phase of NF- $\kappa$ B activation mainly consists of the regulated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and is triggered by prototypical activators such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , lipopolysaccharide (LPS), IL-1 $\beta$  and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). These stimuli induce the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  at Ser-32 and Ser-36 in the N-terminal signal responsive domain by the canonical I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which is composed of two catalytic subunits called IKK $\beta$  and  $\alpha$  and one regulatory subunit called IKK $\gamma$ . Phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  is subsequently polyubiquitinated and targeted to the 26S proteasome complex, resulting in the release and nuclear accumulation of NF- $\kappa$ B, which can now stimulate target gene transcription (17). The IKK complex can also modulate the activity of the NF- $\kappa$ B pathway by directly targeting p65 (RelA) and c-Rel subunits (17) Notably, we and others have shown that the signaling cascade coupling the engagement of the AT1R to an inflammatory response involving NF- $\kappa$ B transcription factors required the activation of the IKK $\beta$  subunit (5,18). Due to the

importance of the IKK/NF- $\kappa$ B module in several pathologies, the intricacy of IKK complex activation and modulation is currently under intensive investigation (19-22).

Like many protein kinases, both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  contain activation loops that need to be phosphorylated to become activated (23). Replacement of these phosphoacceptor sites within the T-loop in IKK $\beta$  (S177/S181) with alanines [IKK $\beta$ (AA)] prevents kinase activation, and thus, when overexpressed, acts in a dominant negative fashion and prevents IKK complex and NF- $\kappa$ B (23). Importantly, both serines are phosphorylated *in vivo* in response to pro-inflammatory stimuli (23). IKK $\alpha$  also becomes phosphorylated at the corresponding serines (S176/S180) during cell stimulation. However, in most cell types, IKK $\alpha$  phosphorylation and activation is less critical than IKK $\beta$  (24,25). In addition to phosphorylation, Lys63-linked polyubiquitination is another essential covalent modification required for IKK complex activation by membrane bound receptors (19). Lys63-linked polyubiquitination reactions are proposed to create docking platforms for the recruitment and the activation of the IKK complex (through Lys63-linked IKK $\gamma$  polyubiquitination) as well as for the activation of two mitogen-activated protein (MAP)-kinase-kinase-kinase (MAPKKK) family members, namely MEKK3 and TAK1 (19). These two protein kinases act as IKK-activating kinases (that induce IKK $\beta$  phosphorylation in the T-loop) (17,19).

Genetic data about the molecular links between GPCR proximal events and activation of the IKK complex now demonstrate that a complex formed by CARMA3, Bcl10, and MALT1, better known as the CBM signalosome, constitute the missing link between G protein coupled-receptors (GPCRs) and IKK complex activation (20, 26-28). In this complex, the ubiquitin E3 ligase MALT1 could act as the effector protein in AT1R signaling by inducing Lys63-linked IKK $\gamma$  polyubiquitination and IKK complex activation (26). On the other hand, in T cell receptor (TCR) signaling, the E3 ubiquitin ligase TRAF6 and TAK1 act downstream of Bcl10 and MALT1 in mediating IKK complex activation (29). Thus, the identification of the E3 ubiquitin ligase and the IKK-activating kinase involved in coupling the AT1R to the activation of the IKK complex is still unknown. The present study was undertaken to characterize the signaling

cascades controlling the phosphorylation and activation of the IKK complex in primary VSMC exposed to Ang II.

## **Experimental procedures**

### *Reagent, antibodies, and plasmids*

Angiotensin II was purchased from Sigma (Saint Louis, MO); Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB and TNF- $\alpha$  were purchased from BioSource (Camarillo, CA). The MEK1/2 inhibitors UO126 and PD184352, the PKC $\alpha/\beta$  inhibitor Gö6976, and the intracellular calcium-specific chelator BAPTA-AM were purchased from Calbiochem (Gibbstown, NJ). The selective RSK inhibitor BI-D1870 was kindly donated by Dr. Philippe Roux (Université de Montréal). p100 polyclonal antibody was a gift from Dr. John Hiscott (McGill University). The commercial antibodies were purchased from the following suppliers: anti-IKK $\alpha/\beta$  (SC-7607) and anti-TAK1 (SC-948) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-TRAF6 (IMG-5654-2) from Imgenex (San Diego, CA); anti- $\beta$ -actin clone AC-74 (A5316) from Sigma (Saint Louis, MO); phospho-TAK1 (Thr184/187) antibody (#4531), anti-TAK1 (#4505), phospho-IKK $\alpha/\beta$  (Ser180/Ser181) antibody (#2681), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (#9101), anti-ERK1/2 (#9102), anti-PKC $\alpha$  (#2056), anti-RSK1/2/3 (#9347) and anti-NIK (#7211) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Glutathione-S-transferase (GST)-I $\kappa$ B $\alpha$  (a.a 1-54) has been described (18). The GST-IKK $\beta$  T-loop (a.a 125-208) recombinant protein was produced by subcloning PCR-amplified fragments in pGEX-KG. The resulting construct was transformed in *Escherichia coli* and following isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (1 mM for 3 hours at 37°C), purified over a glutathione agarose column (Amersham). The expression plasmid pTrack-Flag-IKKB (K44A), the pRL-TK, and the luciferase NF- $\kappa$ B reporter, pLuc-(PRDII)2, were provided by Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, QC). The pCDNA3.1-HA-AT1R plasmid was kindly donated by Dr. Stéphane Laporte (McGill University, Montreal, QC). The pCMVT-TAK1 K63W plasmid was provided by Dr. Jun Ninomiya-Tsuji's (North Carolina State University, Raleigh, NC). The expression construct pCMV5-MEKK3 WT was obtained from Gary



L. Johnson and purchased through Addgene (Cambridge, MA) (plasmid 12186). From this vector, the pCMV5-MEKK3 K391M plasmid was produced by site-directed mutagenesis.

### *Cell types*

Low passages primary rat aortic VSMCs were obtained from Dr. Darren Richard (Hôtel-Dieu de Québec, QC, Canada) and grown in high glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. All experiments were conducted on cells at passage levels 9-16. Quiescent VSMCs were obtained by incubation of 95% confluent cell cultures in serum-free high glucose DMEM, Ham's F-12 (1:1) supplemented with 15 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% low endotoxin bovine serum albumin (Sigma, Saint Louis, MO), and 5 µg/ml transferrin (Sigma, Saint Louis, MO) for 48 hours. For experiments with pharmacological inhibitors, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated concentrations of inhibitors for 30 min before addition of Ang II. Qbi-HEK 293A cells, purchased from Q-Biogene (Carisbad, CA), were cultured in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS.

### *Reporter gene assays*

Qbi-HEK 293A in 24 wells (100 000 cells/well) were transfected by calcium phosphate coprecipitation method with 50 ng of pRLTK reporter (*Renilla* luciferase for internal control), 100 ng of pCDNA3.1-HA-AT1R, 200 ng of NF-κB reporter (pLUC-PRDII), and an increasing amount of dominant negative form of pTrack-Flag-IKKβ K44A, pCMV-TAK1 K63W, or pCMV5-MEKK3 K391M. Cells were harvested at 72 hours posttransfection, lysed in passive lysis buffer (Promega, Madison, WI), and assayed for dual-luciferase activity with use of 10 µl of lysate according to the manufacturer's instructions. All firefly luciferase values were normalized to *Renilla* luciferase to control for transfection efficiency.

### *RT real time-PCR analysis*

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen, Burlington, ON), DNase-

treated (Sigma, Saint Louis, MO) and reverse transcribed (1 µg) with SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Burlington, ON) according to manufacturer's instructions. Real-time PCRs were subsequently performed using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Burlington, ON) with the following forward and reverse primers: rat *interleukin (IL6)* 5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3', 5'-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'; rat *18S* 5'-GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAAT-3', 5'-TTGCCCTCCAATGGATCCT-3'; human *IL8* 5'-CTCTCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3', 5'-AACTTCTCCACAACCCTCTGCAC-3'; human  $\beta$ -*actin* 5'-AACTCCATCATGAAGTGTGACG-3', 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGG-3'. qPCRs were performed using the following schedule: denaturation was performed for 5 min at 95°C and for 15 sec between each cycle; annealing was performed for 20 sec at 55°C for *18S*, at 60°C for  $\beta$ -*actin*, and at 65°C for *IL6* and *IL8*; primer extension was done for 25 sec at 72°C.

### *RNA Interference*

VSMCs were transfected with 20 nM siRNA duplexes using Dharmafect 3 reagent. The ON-TARGET plus siRNA targeting PKC $\alpha$  (siRNA1: 5'-GGAGAGAGAUGACGUACGA-3'; siRNA2: 5'-GGAAUGAGUCCUUCACGUU-3'), TAK1 (siRNA1: 5'-GGUGAUAAACACGCCGGAAA-3'; siRNA2: 5'-AUACCAAUGGCUCGGAUAA -3'; siRNA3: 5'-CAUAUCAGGCAACGGGCAA-3'; siRNA4: 5'-CUGAAAUAGAAGCGAGGAU-3'), TRAF6 (siRNA1: 5'-GAGAACAGAUGCCUAAUCA-3'; siRNA2: 5'-GGACAAAGUUGCCGAGAUG-3'; siRNA3: 5'-GUGUUUGGCUGUCACGAAA-3'; siRNA4: 5'-AGAGCAUGCAUGUGAGCGA-3'), RSK1 (5'-UCGAGAUUCUUCUGCGGUA-3'), RSK2 (5'-GGAAUAAGCUGUAUCGCAA-3'), RSK3 (5'-CAGAUUAGGUGCCGGACCA-3') and IKK $\beta$  (5'-AAACCAGCAUCCAGAUUGA-3') were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO).

### *Immunoblot analysis*

After the different treatments, cells were washed twice with ice-cold phosphate-

buffered saline (PBS), and whole cell extracts were prepared using Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate,  $10^{-4}$ M phenylmethylsulfonyl fluoride,  $10^{-6}$ M leupeptin,  $10^{-6}$ M pepstatin A, 1% Triton X-100, 10% glycerol) for 30 min at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 10 min, and equal amounts of lysate proteins (30-60  $\mu$ g) were subjected to electrophoresis on 7.5 % or 12 % acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol. Immunoblot analysis for each antibody was carried out according to manufacturer's instructions. In some Western blot experiments, cellular extracts were equally divided ( $\mu$ g) and used in parallel.

#### *In vitro kinase assays*

The phosphotransferase activity of the IKK complex and TAK1 was measured as described previously (18). Briefly, 500  $\mu$ g of whole cell extracts were incubated for 4 hours at 4°C with specific antibody to IKK $\alpha/\beta$  (SC-7607) or TAK1 (SC-948) preabsorbed to protein-A-sepharose beads. The immune complexes were washed twice with lysis buffer and twice with kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM EGTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP), 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate,  $10^{-4}$ M phenylmethylsulfonyl fluoride). IKK complex and TAK1 activities were assayed by resuspending the beads in 20  $\mu$ l of kinase buffer 2x containing 2  $\mu$ g of GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (a.a 1-54) for IKK complex or GST-IKK $\beta$  T-loop (a.a 125-208) for TAK1; 20  $\mu$ M ATP; and 20  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 60 min and stopped by the addition of 5X Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Following Coomassie staining, the gels were dried and exposed to a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham) for imaging and quantification.

#### *Electromobility shift assays (EMSA)*

After the different treatments, VSMCs were washed with ice cold PBS and resuspended in 200  $\mu$ l of buffer A (10 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM sodium fluoride, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate,  $10^{-4}$  M phenylmethylsulfonyl fluoride,  $10^{-6}$  M leupeptin and  $10^{-6}$  M pepstatin A). The cells were incubated on ice for 15 min. Nonidet P40 (10%) was added to a final concentration of 0.5%; the cells were vortexed vigorously and centrifuged for 30 s at 4°C. The nuclear pellets were washed in 100  $\mu$ l of buffer A and centrifuged for 30 s at 4°C. The pellets were then resuspended in 50  $\mu$ l of 20 mM HEPES pH 7.4, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate,  $10^{-4}$  M phenylmethylsulfonyl fluoride,  $10^{-6}$  M leupeptin, and  $10^{-6}$  M pepstatin A and incubated on ice for 20 min. Supernatants were collected after a centrifugation of 10 min at 4°C. 10  $\mu$ g of nuclear extracts were subjected to electrophoretic mobility-shift analysis (EMSA) with the NF- $\kappa$ B oligonucleotide: 5'-ACCAAGAGGGATTTCACCTAAATC-3' and the NF $\kappa$ B 5x binding buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 125  $\mu$ g/ml poly (dl:dC), 5 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 30% glycerol). In each reaction, 500 000 CPM of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-labeled probe was used, and bandshifts were resolved on 5% polyacrylamide gels in 0.5x TBE running buffer.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparison of two groups was carried out using a two-tailed unpaired *t*-test, and comparison of more than two groups was carried out with one-way ANOVA and a Bonferroni posttest. Statistical significance was accepted at a *P*-value below 0.05. The number of independent experiments is denoted by 'n'.

## Results

### ***Essential role of IKK $\beta$ in the proinflammatory actions of Ang II***

We and others have recently demonstrated AT1R-mediated activation of the IKK complex in primary VSMC exposed to Ang II (5,18). Other studies have rather suggested a role of the noncanonical pathway, mediated by the MAPKKK family member NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and IKK $\alpha$ , in the proinflammatory effect of Ang II (30,31). To ascertain the role of the IKK $\beta$  subunit in the proinflammatory effect of the octapeptide, we first verified the Ang II response in a heterologous cell system overexpressing the AT1R and a dominant negative version of IKK $\beta$  (IKK $\beta$  DN). Expression of the AT1R in 293 cells allows Ang II to strongly enhance NF- $\kappa$ B promoter activity, which was significantly inhibited by co-transfecting increasing amounts of IKK $\beta$  DN (Fig. 1A). IKK $\beta$  subunit was also essential for Ang II-induced *il8* transcription in 293 cells (Fig. 1B) as well as rapid *il6* transcription in VSMC, where IKK $\beta$  subunit level was reduced by means of siRNA treatment (Fig. 1C). Together these data confirmed the essential role of the IKK $\beta$  subunit in the proinflammatory action of Ang II.

In cultured primary B cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs), the expression level of NIK is undetectable since it is constitutively degraded by the proteasome (32). Activation of the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway by a select group of TNF receptors such as CD40 and lymphotoxin receptor is rather a long process, which needs first the stabilization of NIK through the degradation of the E3 ligase TRAF3 (32). Once accumulated to a certain threshold, this MAPKKK then induces T-loop phosphorylation of IKK $\alpha$ , an effect that ultimately leads to the processing of p100 to p52 (19). In accordance with a lack of a significant effect of Ang II in inducing IKK $\alpha$  phosphorylation following minutes of stimulation (see Figs. S1A and 2A), the expression level of TRAF3 was only marginally affected by Ang II treatment for up 1 hour of stimulation, which correlated with the incapacity to detect significant expression of endogenous NIK and the processing of p100 (see Fig. S1B and S1C). Therefore, phosphorylation of IKK $\beta$  is likely the signaling mechanism by which the

AT1R (and other GPCR, see below) is coupled to the rapid induction of the NF- $\kappa$ B pathway.

### ***Early signaling events implicated in t-loop phosphorylation and activation of IKK $\beta$***

The use of an anti-phospho-IKK $\alpha/\beta$  (Ser180/Ser181) antibody in Western blot analysis revealed that Ang II induced a rapid (as early as 15 sec) and sustained T-loop phosphorylation of IKK $\beta$  (Fig. 2A). The phosphosignal of IKK $\beta$  further increases after 5 and 15 minutes of stimulation. PDGF-BB also induced T-loop phosphorylation of IKK $\beta$  but only at times where protein kinases ERK1 and ERK2 were phosphorylated.

We decided to use this assay to decipher the signaling cascades responsible for the phosphorylation and activation of IKK $\beta$ . Ang II treatment of VSMC resulted in a very rapid phosphorylation of IKK $\beta$ , an effect likely mediated by the generation of second messengers such as calcium and diacylglycerol (DAG). Thus, we next verified the role of DAG/calcium-dependent PKCs (known as conventional PKCs) in IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B activation. Pretreatment of VSMC with the calcium chelator BAPTA-AM and the conventional PKC inhibitor Gö6976 abrogated the early signaling events leading to IKK $\beta$  phosphorylation (Fig. 2B and C). The same results were observed for other agonists (thrombin and bradikinin) that bind GPCRs coupled to the G $\alpha$ q-PLC pathway (data not shown). Importantly, the decrease in IKK $\beta$  phosphorylation caused by these treatments correlated with a significant reduction in Ang II's ability to increase the phosphotransferase activity of IKK $\beta$  as well as the DNA binding activity of NF- $\kappa$ B dimers composed of p65 and p50 (see Figs. 2D to 2G). Together, these results demonstrate the involvement of a PKC-dependent pathway controlling early phosphorylation of IKK $\beta$ , which is a modification required for full activation of the IKK complex pathway following AT1R engagement.

### ***A role of TRAF6-TAK1 pathway in T-loop phosphorylation of IKK $\beta$ by Ang II***

Direct phosphorylation of IKK $\beta$  by the atypical family member PKC $\zeta$  has been demonstrated (33). To our knowledge, direct phosphorylation of the IKK complex by conventional PKCs has never been described. Rather, PKCs isoforms play important roles in cytokine and antigen signaling, leading to IKK complex activation through phosphorylation of TRAF2 (34) and the scaffolding proteins CARMA1 and CARMA3 (35). Importantly, CARMA3 was recently demonstrated to play important roles in GPCR signaling to the NF- $\kappa$ B pathway (20,26). Phosphorylated CARMA3 is thought to recruit Bcl10 and MALT1 to form the CBM signalosome. This complex then activates the IKK complex through an ubiquitination-dependent pathway involving the E3 ubiquitin ligases MALT1 or TRAF6 (29,36). Since it is still unknown which E3 ubiquitin ligases are used by the AT1R to activate the IKK complex, we next verified the role of TRAF6 in Ang II-induced IKK $\beta$  T-loop phosphorylation. Lowering the expression level of TRAF6 with four different siRNA duplexes resulted in a dramatic reduction of phosphorylated IKK $\beta$  in the early time point of stimulation with Ang II (Fig. 3A). It also affected IKK $\beta$  phosphorylation after 10 minutes of stimulation but to a lesser extent (Fig. 3B). These data demonstrate the importance of the early signaling events converging to the activation of TRAF6, which is required for phosphorylation of IKK $\beta$ . They also suggest the role of another intracellular pathway independent of TRAF6 in later time points.

Receptor-dependent recruitments and oligomerization of TRAF6 is proposed to increase the latter's polyubiquitinating activity, which results in the recruitment and activation of two MAPKKK family members, TAK1 and MEKK3 (17,19). Thus, we next verified the roles of these two proteins kinases in AT1R signaling to the IKK complex. Increasing amounts of DNA plasmid encoding for a dominant negative version of TAK1, but not MEKK3, significantly inhibited Ang II-induced NF- $\kappa$ B promoter activation in 293 cells expressing the AT1R (Fig. 4A). We therefore addressed whether stimulation of the AT1R was coupled to the activation of TAK1 in VSMC. Phosphoblot analysis demonstrated that Ang II-induced phosphorylation of TAK1 and IKK $\beta$  followed an identical kinetic pattern (Fig. 4B). Importantly, the Ang II-dependent TAK1 phosphosignal observed in Western blot analysis was totally dependent on the

presence of TRAF6 (Fig. 3). Moreover, it correlated with an increase in TAK1 phosphotransferase activity toward a recombinant GST-IKK $\beta$  peptide containing the activating T-loop sequence (Figs. 4C and 4D). Importantly, as observed for TRAF6, the efficacy of silencing the expression level of TAK1 with a mix of four different siRNA duplexes (smartpool) (Fig. 4E) or distinct siRNA duplexes (Figs. 4F and 4G) correlated with a significant diminution in the early phosphorylation of IKK $\beta$ , an effect that also affected the full IKK $\beta$  phosphorylation observed after 10 minutes of stimulation (Fig. 4E). Thus, a TRAF6-TAK1 signaling cascade is involved in Ang II-induced IKK $\beta$  phosphorylation and activation.

The mechanistic details of CBM signalosome formation and the specific PKC isoforms that link the AT1R to CBM remain to be identified (26). Because of the effect of the conventional PKC inhibitor on IKK $\beta$  phosphorylation (Fig. 2), we then decided to verify the role of the PKC $\alpha$  isoform in the early TRAF6-TAK1 signaling event. Reducing the expression level of PKC $\alpha$  with two different siRNA duplexes significantly diminished Ang II-induced TAK1 phosphorylation in primary VSMC (Figs. 4H and 4I). Importantly, this approach also affected the phosphorylation of IKK $\beta$  indicating that PKC $\alpha$  acts upstream of TAK1, likely at the level of CARMA3 (35).

### ***A MEK1/2-ERK-RSK pathway is involved in late signaling events leading to phosphorylation and activation of IKK $\beta$ by Ang II***

We observed that delayed phosphorylation of IKK $\beta$  occurred when ERK1/2 were activated (starting at 5 min of stimulation with Ang II; Fig. 2 A to C). To verify whether the MEK1/2-ERK1/2 pathway could be involved in IKK $\beta$  T-loop phosphorylation and activation, two unrelated allosteric MEK1/2 inhibitors, UO126 and PD184352, were used to efficiently block the phosphorylation of ERK1/2 in response to Ang II (Fig. 5A and B). Interestingly, only the late phase of Ang II-induced IKK $\beta$  phosphorylation (5-15 min of stimulation) was affected by these treatments. The same results were observed with the use of thrombin as another GPCR ligand coupled to the G $\alpha_q$  pathway (data not shown). The use of UO126 also affected the capacity of Ang II to fully activate the phosphotransferase activity of the IKK complex and the DNA binding activity of NF- $\kappa$ B (Figs. 5C to 5F). Since RSK is a well-defined



target of ERK1/2 protein kinases, we next addressed its role in the late phase of IKK $\beta$  phosphorylation. As observed for the MEK1/2 inhibitors, the use of BI-D1870, a novel RSK1-4 inhibitor (37), significantly affected the late phase of IKK $\beta$  phosphorylation (Fig. 5G). This novel compound inhibitor had also a weak effect on the early phase possibly due to the fact that it was shown to partially inhibit PKC $\alpha$  *in vitro* (37). However, the use of siRNA against RSK1,2 and 3 clearly indicated a role of RSKs isoforms in the late T-loop phosphorylation of IKK $\beta$  by Ang II, (Fig. 5H). Importantly, both the early phase and late phase of Ang II-induced IKK $\beta$  T-loop phosphorylation were completely blunted when the conventional PKC and MEK1/2 inhibitors were used simultaneously (Fig. 5I).

### ***Dual pathways control the inflammatory response of VSMC exposed to Ang II***

Our data demonstrate that the AT1R is coupled to two independent intracellular pathways leading to T-loop phosphorylation of IKK $\beta$  and required for full activation of the IKK complex and the DNA binding activity of the NF- $\kappa$ B dimers. The contributions of inflammatory cytokines, including IL-6, to the pathogenesis of atherosclerosis have been well documented (38-41). Thus, to further substantiate the role of these pathways in the proinflammatory actions of Ang II, we next conducted RT-qPCR analysis to measure *il6* mRNA expression in VSMC exposed to pharmacological inhibitors and siRNA duplexes targeting TAK1, PKC $\alpha$  and RSK isoforms. Reducing the expression level of PKC $\alpha$  and TAK1 significantly diminished the induction of *il6* mRNA in response to Ang II (Figs. 6A and 6B). This effect was also observed in cells exposed to MEK1/2 and RSK inhibitors as well as siRNA duplexes targeting RSK isoforms (Fig. 6C to 6E). Importantly, the proinflammatory effect of the octapeptide was totally blunted by co-treatment with a siRNA duplex targeting PKC $\alpha$  and the UO126 MEK1/2 inhibitor (Fig. 6F).

## **Discussion**

When providing protection against infection, it is generally thought that a controlled inflammatory response is beneficial for the host. However, fundamental

research has compiled evidence that inflammation can become detrimental if deregulated. The best example of this deregulation is observed in septic shock, which occurs after a non-controlled acute inflammatory response to infection. Much less is known however about the causes and molecular mechanisms of chronic inflammation, which is now recognized as an underlying factor in the development and progression of many chronic diseases such as cancer, type II diabetes, autoimmune disorders, and cardiovascular diseases. Therefore, the delineation of the molecular mechanisms and, particularly, the signaling pathways involved in the regulation of genes encoding cytokines and chemokines is of high priority for identifying new potential therapeutic strategies to combat these diseases. Through the induction of a repertoire of NF- $\kappa$ B -regulated genes such as *IL-6*, *MCP-1*, *IL-8*, *RANTES*, *VCAM-1*, and *ICAM-1*, it is now recognized that Ang II participates in these key events of the inflammatory response leading to the development of atherosclerosis (42). Whereas the pathways leading to NF- $\kappa$ B activation following treatment with prototypical activators such as TNF $\alpha$ , lipopolysaccharide, IL-1 $\beta$ , and antigen receptors is well characterized (17), the molecular understanding of the signaling pathways that are involved in the coupling of GPCR, such as AT1R to NF- $\kappa$ B, is still unclear. Previous reports have suggested that the proinflammatory activity of Ang II relied on the activation of the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway (30,31). However, this pathway is unlikely to be responsible for the early NF- $\kappa$ B signature that take place in VSMC exposed to Ang II since the expression level of NIK is almost undetectable in quiescent VSMC exposed to Ang II for up to 1 hour. On the other hand, numerous studies have demonstrated the role of conventional PKCs in Ang II-induced NF- $\kappa$ B activation (43-45). Studies on antigen receptors signaling have also highlighted the role of PKC in this process. Following T and B cell receptor engagement, the novel isoform PKC $\theta$  (in T cells) and the conventional isoform PKC $\beta$  (in B cells) phosphorylate the scaffold protein CARMA1, which in turn recruits Bcl10 and MALT1 to form the CBM complex. This leads to the activation of MALT1 and TRAF6 ubiquitin E3 ligases and to IKK complex activation (46,47). As opposed to CARMA1, whose expression is largely restricted to lymphocytes, CARMA3 was recently demonstrated to be highly expressed in Ang II-sensitive tissues and involved

in NF- $\kappa$ B activation by Ang II (26). However, it was still unknown how this complex regulates the activation of the IKK complex following Ang II stimulation. Through a series of biochemical, molecular, and genetic approaches, our work identifies two novel effectors in Ang II signaling: the E3 ubiquitin ligase TRAF6 and the serine-threonine protein kinase TAK1. Moreover, we demonstrate a novel role of the MEK1/2-ERK-RSK pathway in coupling the AT1R to the activation of the IKK complex. We propose that an early PKC $\alpha$ -CBM complex-TRAF6-TAK1 pathway is responsible for the second messenger-dependent phosphorylation and activation of IKK $\beta$ . This early phosphorylation of IKK $\beta$  by TAK1 is then followed by a second wave of IKK $\beta$  phosphorylation that requires the MEK1/2-ERK1/2-RSK pathway (see Fig. 7 for detailed mechanism). Several observations support this proposition. First, pharmacological inhibition of conventional PKCs and intracellular calcium chelation totally blunt the early T-loop phosphorylation of IKK $\beta$  and affected full activation of the IKK complex (as observed by the reduced phosphosignal, the reduced phosphotransferase activity, and the reduced DNA binding activity (Fig. 2)). Second, our data demonstrate, for the first time, the phosphorylation and activation of TAK1 by Ang II, which closely follows the kinetic pattern of IKK $\beta$  phosphorylation (Figs. 4B and 4C). Third, silencing the expression of PKC $\alpha$  affected both T-loop phosphorylation of TAK1 and IKK $\beta$  (Fig. 4H), demonstrating that PKC $\alpha$  acts upstream of these protein kinases in AT1R signaling. Moreover, silencing the expression of PKC $\alpha$  also affected *il6* mRNA induction (Fig. 6A). Fourth, silencing the expression of TRAF6 and TAK1 also diminished: 1) the onset of IKK $\beta$  phosphorylation (Figs. 3A and 4E to 4G); 2) the sustained phosphorylation of IKK $\beta$  observed at 10 minutes of stimulation (Figs. 3B and 4E); and 3) *il6* mRNA induction by Ang II (Fig. 6B). Fifth, delayed phosphorylation of IKK $\beta$  requires the MEK1/2-ERK1/2-RSK pathway and is responsible for full activation of the IKK complex and NF- $\kappa$ B activation (Figs. 5, 6C to 6E). Finally, targeting both the PKC $\alpha$ -TRAF6-TAK1 and the MEK1/2-ERK1/2-RSK pathways totally blunts the phosphorylation of IKK $\beta$  (Fig. 5I) and the proinflammatory actions of Ang II (Fig. 6F). Another GPCR ligand, lysophosphatidic acid (LPA), was recently shown to also use a CARMA3-TRAF6 pathway to activate the IKK complex (20). However, in opposition to our results, the authors propose a model in which TRAF6

mediates LPA-induced NF- $\kappa$ B activation through an IKK $\beta$  phosphorylation-independent mechanism. Thus, in LPA signaling, TRAF6 would be involved in the polyubiquitination of IKK $\gamma$ -associated proteins without controlling the activation of a putative IKK-activating kinase such as TAK1. In addition, MEKK3, instead of TAK1, acts as the IKK-activating kinase in their proposed model (48). These discrepancies between LPA and Ang II signaling to the IKK complex are currently unknown but could be related to the use of different cellular models and technologies (MEFs versus primary VSMC, and transient siRNA knockdown versus gene disruption).

Autoubiquitination of TRAF6 at Lys-124 is required for its activity towards TAK1 and IKK (19). Activated TRAF6 is also proposed to induce Lys63-linked polyubiquitination of several downstream effectors such as IKK $\gamma$  and the TAK1 adapter proteins TAB2 and TAB3 allowing transphosphorylation of the IKK complex and TAK1 respectively (see Fig. 7 for detailed mechanism). In addition to the polyubiquitination of downstream effectors, it was recently demonstrated *in vitro* that TAK1 and the IKK complex become activated by free LysK63-linked polyubiquitin chains produced by TRAF6. (21) This new concept of free LysK63-linked polyubiquitin chains acting as second messenger molecules could be as important as DAG for conventional and novel PKC activation. More work is needed to verify whether the AT1R, and GPCR activation in general, induce the production of free LysK63-linked polyubiquitin chains.

Our data also demonstrate that MEK1/2-ERK1/2 modules serve as activators of the IKK complex by stimulating RSK. Through the phosphorylation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit, the RSK family has already been proposed to act as effectors leading to activation of the NF- $\kappa$ B pathway in Ang II-stimulated cells (6). On the other hand, DNA damaging agents use a RSK pathway to increase the phosphotransferase activity of the IKK complex (49). However, the molecular details of IKK activation following activation of ERK1/2-RSK remain elusive since RSK does not directly phosphorylate IKK $\beta$  (49). In this scenario, it is possible that ERK-mediated phosphorylation of RSK promotes increased interaction of RSK with the IKK complex.

Once in this microenvironment, RSK could target IKK $\gamma$ , enhancing IKK $\beta$  phosphotransferase activity. Work is in progress to verify this hypothesis.

In conclusion, we propose that a portion of AT1R signaling to the IKK complex used similar intracellular pathways as TCR and BCR receptors, i.e., PKC-CMB complex-TRAF6-TAK1-IKK complex. The extent to which the present mechanism can account for the known proinflammatory actions of Ang II in the cardiovascular system is unknown at the moment. Whereas the therapeutic potential for PKC in atherosclerosis has recently been discussed (50), it is worth mentioning that TRAF6 is also now considered an important effector of vascular remodeling-associated diseases such as atherosclerosis and restenosis (51-53). The demonstration that the ERK-RSK pathway is also required for full IKK complex and NF- $\kappa$ B transcription factor activation by Ang II was unexpected but could have important implications for future effective treatment. Indeed, inhibition of the MEK1/2 pathway could diminish both the growth (8) and proinflammatory actions of Ang II (this study), two cellular processes involved in tissue remodeling events.

## References

1. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. (2000) *Pharmacol Rev* 52, 415-472
2. Bader, M. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 439-465
3. Paul, M., Poyan Mehr, A., and Kreutz, R. (2006) *Physiol Rev* 86, 747-803
4. Lee, M. A., Bohm, M., Paul, M., and Ganten, D. (1993) *Circulation* 87, IV7-13
5. Zhang, L., Cheng, J., Ma, Y., Thomas, W., Zhang, J., and Du, J. (2005) *Circ Res* 97, 975-982
6. Zhang, L., Ma, Y., Zhang, J., Cheng, J., and Du, J. (2005) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1148-1153
7. Servant, M. J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S. (2000) *J Cell Biol* 148, 543-556
8. Servant, M. J., Giasson, E., and Meloche, S. (1996) *J Biol Chem* 271, 16047-16052
9. Karin, M. (2005) *Proc Am Thorac Soc* 2, 386-390; discussion 394-385
10. Karin, M., and Greten, F. R. (2005) *Nat Rev Immunol* 5, 749-759
11. Barnes, P. J., and Karin, M. (1997) *N Engl J Med* 336, 1066-1071
12. Monaco, C., and Paleolog, E. (2004) *Cardiovasc Res* 61, 671-682
13. Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006) *Cell* 124, 823-835
14. Monaco, C., Andreacos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., Cheshire, N., Paleolog, E., and Feldmann, M. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5634-5639
15. de Winther, M. P., Kanters, E., Kraal, G., and Hofker, M. H. (2005) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 904-914
16. Gareus, R., Kotsaki, E., Xanthoulea, S., van der Made, I., Gijbels, M. J., Kardakaris, R., Polykratis, A., Kollias, G., de Winther, M. P., and Pasparakis, M. (2008) *Cell Metab* 8, 372-383
17. Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009) *Annu Rev Immunol* 27, 693-733
18. Douillette, A., Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Clement, J. F., Chenard, V., Moreau, P., and Servant, M. J. (2006) *J Biol Chem* 281, 13275-13284

19. Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z. J. (2009) *Annu Rev Biochem* 78, 769-796
20. Grabiner, B. C., Blonska, M., Lin, P. C., You, Y., Wang, D., Sun, J., Darnay, B. G., Dong, C., and Lin, X. (2007) *Genes Dev* 21, 984-996
21. Xia, Z. P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., and Chen, Z. J. (2009) *Nature* 461, 114-119
22. Xu, M., Skaug, B., Zeng, W., and Chen, Z. J. (2009) *Mol Cell* 36, 302-314
23. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999) *Science* 284, 309-313
24. Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999) *Science* 284, 316-320
25. Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999) *J Exp Med* 189, 1839-1845
26. McAllister-Lucas, L. M., Ruland, J., Siu, K., Jin, X., Gu, S., Kim, D. S., Kuffa, P., Kohrt, D., Mak, T. W., Nunez, G., and Lucas, P. C. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 139-144
27. Wang, D., You, Y., Lin, P. C., Xue, L., Morris, S. W., Zeng, H., Wen, R., and Lin, X. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 145-150
28. Klemm, S., Zimmermann, S., Peschel, C., Mak, T. W., and Ruland, J. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 134-138
29. Sun, L., Deng, L., Ea, C. K., Xia, Z. P., and Chen, Z. J. (2004) *Mol Cell* 14, 289-301
30. Choudhary, S., Lu, M., Cui, R., and Brasier, A. R. (2007) *Mol Endocrinol* 21, 2203-2217
31. Wu, L., Iwai, M., Li, Z., Li, J. M., Mogi, M., and Horiuchi, M. (2006) *J Hypertens* 24, 123-130
32. Zarnegar, B. J., Wang, Y., Mahoney, D. J., Dempsey, P. W., Cheung, H. H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W. C., Mak, T. W., Korneluk, R. G., and Cheng, G. (2008) *Nat Immunol* 9, 1371-1378
33. Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Paya, C. V., and Moscat, J. (1999) *Mol Cell Biol* 19, 2180-2188
34. Li, S., Wang, L., and Dorf, M. E. (2009) *Mol Cell* 33, 30-42

35. Wegener, E., and Krappmann, D. (2007) *Sci STKE* 2007, pe21
36. McAllister-Lucas, L. M., and Lucas, P. C. (2008) *Nat Immunol* 9, 231-233
37. Sapkota, G. P., Cummings, L., Newell, F. S., Armstrong, C., Bain, J., Frodin, M., Grauert, M., Hoffmann, M., Schnapp, G., Steegmaier, M., Cohen, P., and Alessi, D. R. (2007) *Biochem J* 401, 29-38
38. Seino, Y., Ikeda, U., Ikeda, M., Yamamoto, K., Misawa, Y., Hasegawa, T., Kano, S., and Shimada, K. (1994) *Cytokine* 6, 87-91
39. Charo, I. F., and Taubman, M. B. (2004) *Circ Res* 95, 858-866
40. Brasier, A. R. *Cardiovasc Res*
41. Han, Y., Runge, M. S., and Brasier, A. R. (1999) *Circ Res* 84, 695-703
42. Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., and Egido, J. (2003) *Int J Biochem Cell Biol* 35, 881-900
43. Kalra, D., Sivasubramanian, N., and Mann, D. L. (2002) *Circulation* 105, 2198-2205
44. Jamaluddin, M., Meng, T., Sun, J., Boldogh, I., Han, Y., and Brasier, A. R. (2000) *Mol Endocrinol* 14, 99-113
45. Brasier, A. R., Jamaluddin, M., Han, Y., Patterson, C., and Runge, M. S. (2000) *Mol Cell Biochem* 212, 155-169
46. Shinohara, H., and Kurosaki, T. (2009) *Immunol Rev* 232, 300-318
47. Matsumoto, R., Wang, D., Blonska, M., Li, H., Kobayashi, M., Pappu, B., Chen, Y., and Lin, X. (2005) *Immunity* 23, 575-585
48. Sun, W., Li, H., Yu, Y., Fan, Y., Grabiner, B. C., Mao, R., Ge, N., Zhang, H., Fu, S., Lin, X., and Yang, J. (2009) *Cell Signal* 21, 1488-1494
49. Panta, G. R., Kaur, S., Cavin, L. G., Cortes, M. L., Mercurio, F., Lothstein, L., Sweatman, T. W., Israel, M., and Arsur, M. (2004) *Mol Cell Biol* 24, 1823-1835
50. Churchill, E., Budas, G., Vallentin, A., Koyanagi, T., and Mochly-Rosen, D. (2008) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 569-599
51. Lutgens, E., Lievens, D., Beckers, L., Wijnands, E., Soehnlein, O., Zernecke, A., Seijkens, T., Engel, D., Cleutjens, J., Keller, A. M., Naik, S. H., Boon, L.,



- Oufella, H. A., Mallat, Z., Ahonen, C. L., Noelle, R. J., de Winther, M. P., Daemen, M. J., Biessen, E. A., and Weber, C. *J Exp Med* 207, 391-404
52. Zirlik, A., Bavendiek, U., Libby, P., MacFarlane, L., Gerdes, N., Jagielska, J., Ernst, S., Aikawa, M., Nakano, H., Tsitsikov, E., and Schonbeck, U. (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1101-1107
53. Miyahara, T., Koyama, H., Miyata, T., Shigematsu, H., Inoue, J., Takato, T., and Nagawa, H. (2004) *Cardiovasc Res* 64, 154-164
54. Sun, J., and Lin, X. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17085-17090

### **Abbreviations:**

Angiotensin II (Ang II); Ang II AT1 receptors (AT1R); Renin Angiotensin System (RAS); vascular smooth muscle cells (VSMC); tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ; lipopolysaccharide (LPS); phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA); I $\kappa$ B kinase (IKK); mitogen-activated protein (MAP); MAP-kinase-kinase-kinase (MAPKKK); T cell receptor (TCR); B cell receptor (BCR); protein kinases C (PKC); mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase (MEK); Ribosomal S6 Kinase (RSK); Tumor Growth Factor $\beta$  Activating Kinase-1 (TAK1); Tumor Necrosis Factor (TNF); TNF Receptor-Associated Factor-6 (TRAF6); Platelet-derived growth factor (PDGF); isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG); interleukin (IL); silencing RNA (siRNA); diacylglycerol (DAG); Phospholipase (PLC); NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK); lysophosphatidic acid (LPA); G protein coupled-receptors (GPCRs).

### **Sources of Funding**

This work was supported by research grants to M.S. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-53282) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC). P.D. is supported by studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and M.S. holds the Canada Research Chair in signaling networks in inflammation.

## Figure Legends

**Figure 1.** Role of IKK $\beta$  in the proinflammatory actions of Ang II. (A) QBI-HEK 293A cells were transiently transfected with the NF- $\kappa$ B reporter plasmid PRDII-Luc together with plasmids encoding for the AT1R and indicated amount of IKK $\beta$ DN or an empty vector. Cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for 18 hrs before cell lysates were prepared for luciferase assays. Data are means  $\pm$  SEM (n=3). (B) QBI-HEK 293A cells were co-transfected with plasmids encoding AT1R and IKK $\beta$ DN or an empty vector. At 24 hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for the indicated times. RNA was extracted and submitted to a RT-PCR analysis using primers for *il6* and *gapdh* as an internal RNA control. Data are means  $\pm$  SD (n=3). (C) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or a RNA duplex that specifically target IKK $\beta$ . At 48 hrs, post-transfection cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for the indicated times. RNA was extracted and submitted to a RT-PCR using primers for *il6* and *18S* as internal RNA controls. The lower panel shows the efficiency of transfection. Data are means  $\pm$  SD (n=3). \* Significantly above conditions without Ang II treatment; # Significantly below the Ang II response; a single symbol indicates P<0.05, two symbols indicate P<0.01, and three symbols indicate P<0.001.

**Figure 2.** Early signaling events implicated in t-loop phosphorylation and activation of IKK $\beta$  in response to Ang II. (A) Quiescent VSMCs were treated with Ang II (100 nM) or PDGF-BB (50 ng/ml) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. Data are representative of at least 4 different experiments. Cellular extracts were used either on 7.5% (panels 2 and 4) or 10% (panels 1 and 3) polyacrylamide gels. (B-C) Quiescent VSMCs were pre-treated with BAPTA-AM (15  $\mu$ M), Gö6976 (10  $\mu$ M), or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment and used as described above. One of four independent experiments with similar results is shown. (D) Quiescent VSMCs were pre-treated with Gö6976 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min

before Ang II (100 nM) exposure for 15 min. Cell lysates were prepared and analyzed for IKK activity using an *in vitro* kinase assay. One of three independent experiments with similar results is shown. (E) Densitometric analysis of IKK phosphotransferase activity presented in Figures 2D. Data are means  $\pm$  SEM of the three pooled experiments. ## Significantly below the DMSO response;  $P < 0.01$ . (F) Quiescent VSMCs were pre-treated with Gö6976 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) exposure for 15 min. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA using NF- $\kappa$ B specific oligonucleotide as a probe. P50 and P65 represent the use of antibodies to supershift (SS) the inducible DNA binding complex composed of p65 and p50 subunits. One of three independent experiments with similar results is shown. G) Densitometric analysis of NF- $\kappa$ B binding activity presented in Figures 2F. Data are means  $\pm$  SEM of the three pooled experiments. # Significantly below the DMSO response;  $P < 0.05$ .

**Figure 3.** Role of TRAF6 in t-loop phosphorylation of IKK $\beta$  and TAK1 in VSMC. (A-B) VSMC were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or 4 different RNA duplexes that specifically target TRAF6. At 48 hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of four independent experiments with similar results is shown.

**Figure 4.** Implication of a PKC $\alpha$ -TRAF6-TAK1 signaling cascade in Ang II-induced t-loop phosphorylation and activation of IKK $\beta$  in VSMCs. (A) QBI-HEK 293A cells were transiently transfected with the NF- $\kappa$ B reporter plasmid PRDII-Luc together with plasmids encoding for the AT1R and indicated amount of TAK1DN (left panel), MEKK3DN (right panel), or an empty vector. Cells were serum-starved for 24hrs and then exposed to Ang II (1  $\mu$ M) for 18hrs before cell lysates were prepared for luciferase assays. Data are means  $\pm$  SEM (n=3). \*Significantly above conditions without Ang II treatment; # Significantly below the Ang II response;  $P < 0.001$ . (B) Quiescent VSMCs were treated with Ang II (100 nM) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated

antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. (C) Quiescent VSMCs were treated with Ang II (100 nM) or TNF $\alpha$  (20 ng/ml) for 15 min. Cell lysates were prepared and analyzed for TAK1 activity using an *in vitro* kinase assay. One of two independent experiments with similar results is shown. (D) Densitometric analysis of TAK1 phosphotransferase activity presented in Fig. 4C. Data are means  $\pm$  SD of the two pooled experiments. \* Significantly above conditions without Ang II treatment;  $P < 0.05$ . (E and F) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or a mix of silencing RNA duplexes (E) or two specific silencing RNA duplexes (F) that target TAK1. At 48 hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. (G) Densitometric analysis of the data presented in Figure 4F. Data are means  $\pm$  SEM of the three pooled experiments. ### Significantly below the Ns;  $P < 0.001$ . (H) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or different silencing RNA duplexes that specifically target PKC $\alpha$ . At 48 hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. (I) Densitometric analysis of the data presented in Figure 4H.

**Figure 5.** A MEK-ERK-RSK pathway is implicated in late signaling events leading to phosphorylation and activation of IKK $\beta$  by Ang II in VSMCs. (A-B) Quiescent VSMCs were pre-treated with U0126 (10  $\mu$ M), PD184352 (2  $\mu$ M), or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. (C) Quiescent VSMCs were pre-treated with U0126 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) exposure for 15 min. Cell lysates were prepared and analyzed for IKK activity using an *in vitro* kinase assay. One of three independent experiments with similar results is shown. (D) Densitometric analysis of IKK phosphotransferase activity presented in Figure 5C.

Data are means  $\pm$  SEM the three pooled experiments. ## Significantly below the DMSO response;  $P < 0.01$ . (E) Quiescent VSMCs were pre-treated with U0126 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) exposure for 15 min. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA using NF- $\kappa$ B specific oligonucleotide as a probe. P50 and P65 represent the use of antibodies to supershift (SS) the inducible DNA binding complex composed of p65 and p50 subunits. One of three independent experiments with similar results is shown. (F) Densitometric analysis of NF- $\kappa$ B binding activity presented in Figure 5E. Data are means  $\pm$  SEM the three pooled experiments. # Significantly below the DMSO response;  $P < 0.05$ . (G) Quiescent VSMCs were pre-treated with BI-D1870 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. (H) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or different silencing RNA duplexes that specifically target RSK1, 2 and 3 isoforms. At 48 hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of two independent experiments with similar results is shown. (I) Quiescent VSMCs were pre-treated with Gö6976 (10  $\mu$ M) and/or with U0126 (10  $\mu$ M) and/or with DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure 6.** Involvement of PKC $\alpha$ , TAK1, and MEK-ERK-RSK pathway in proinflammatory actions of Ang II in VSMCs. (A-B) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or different silencing RNA duplexes that specifically target PKC $\alpha$  or TAK1. At 48hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) treatment for the indicated times. (C) Quiescent VSMCs were pre-treated with U0126 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment for the indicated times. (D) Quiescent VSMCs were pre-treated with BI-D1870 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment

for the indicated times. (E) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or different silencing RNA duplexes that specifically target RSK1,2 and 3 isoforms. At 48hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to Ang II (100 nM) treatment for the indicated times. (F) VSMCs were transfected with a nonsilencing (Ns) RNA duplex or RNA duplex that specifically target PKC $\alpha$ . At 48hrs post-transfection, cells were serum-starved for 24 hrs and then exposed to U0126 (10  $\mu$ M) or DMSO (0.1%) for 30 min before Ang II (100 nM) treatment for the indicated times. RNA was extracted and submitted to a RT-PCR using primers for *il6* and *18S* as an internal control. Data are means  $\pm$  S.D (n=3). \* Significantly above conditions without Ang II treatment; # Significantly below the Ang II response; a single symbol indicates P<0.05, two symbols indicate P<0.01, and three symbols indicate P<0.001.

**Figure 7.** Proposed model for Ang II mediated IKK activation in VSMC. Following binding to AT1R, PKC $\alpha$  induces the formation of the CBM-TRAF6 complex, which is likely recruited to the AT1R via  $\beta$ -arrestin2 (54). Once recruited to the AT1R, TRAF6 becomes activated, autoubiquitinates and possibly induces Lys63-linked polyubiquitination of several downstream effectors such as IKK $\gamma$  and the TAK1 adapter proteins TAB2 and TAB3. Lys63-linked polyubiquitination is thought to provide targeted proteins with an ability to engage in new protein interactions with molecules containing Ubiquitin Binding Domains (UBDs). Since IKK $\gamma$  and TAB2/3 contain UBDs, Lys63-linked polyubiquitination therefore provides the molecular means to orchestrate the interaction between protein complexes allowing TAK1 and the IKK complex to become activated through transphosphorylation. Moreover, once activated, TAK1 phosphorylates IKK $\beta$  to further activate the IKK complex. In addition to the role played by the PKC-CBM-TRAF6 complex, our study also reveals that the optimal activation of the IKK complex is triggered by the MEK1/2-ERK-RSK pathway.

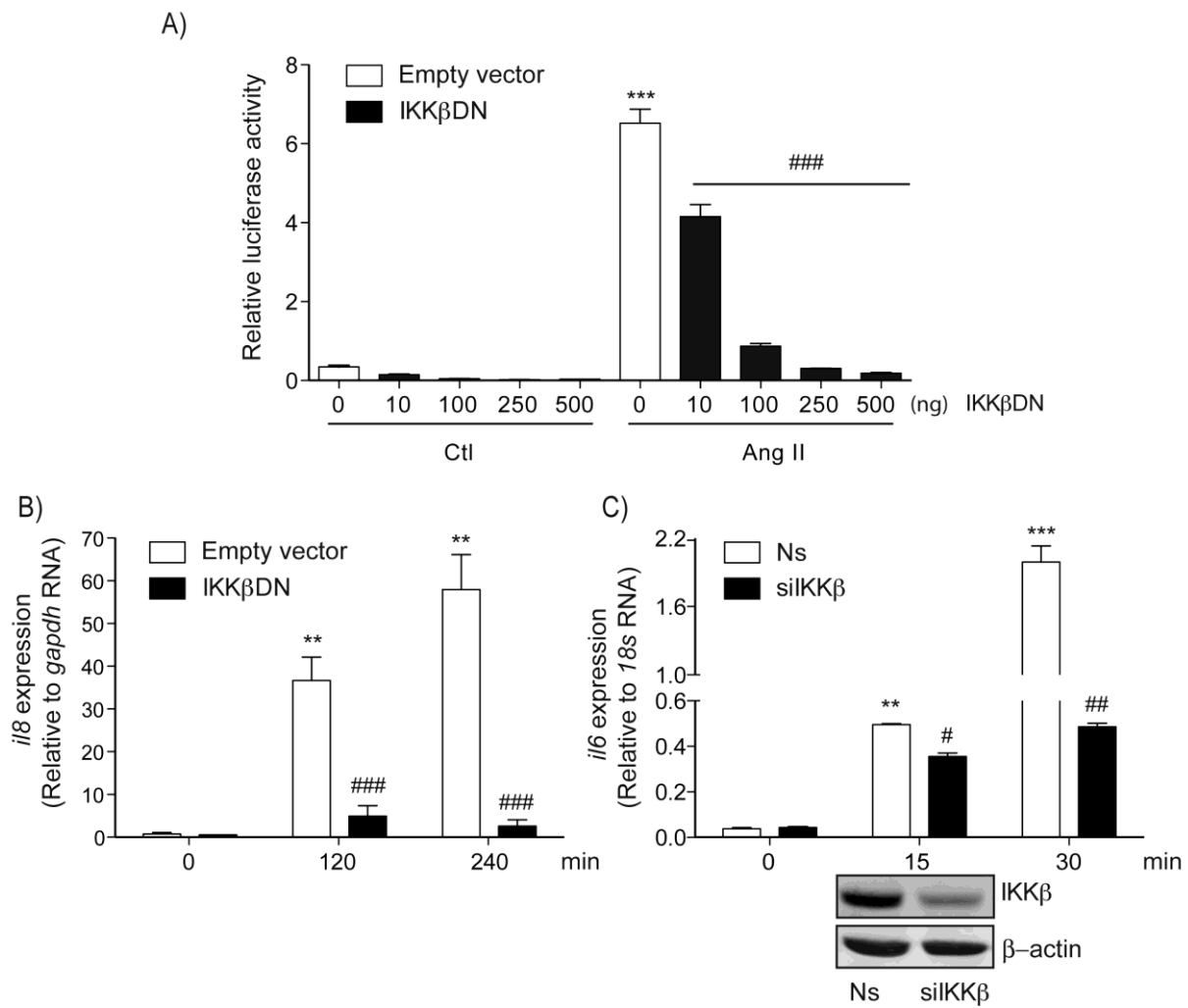


Figure1.  
Doyon & Servant

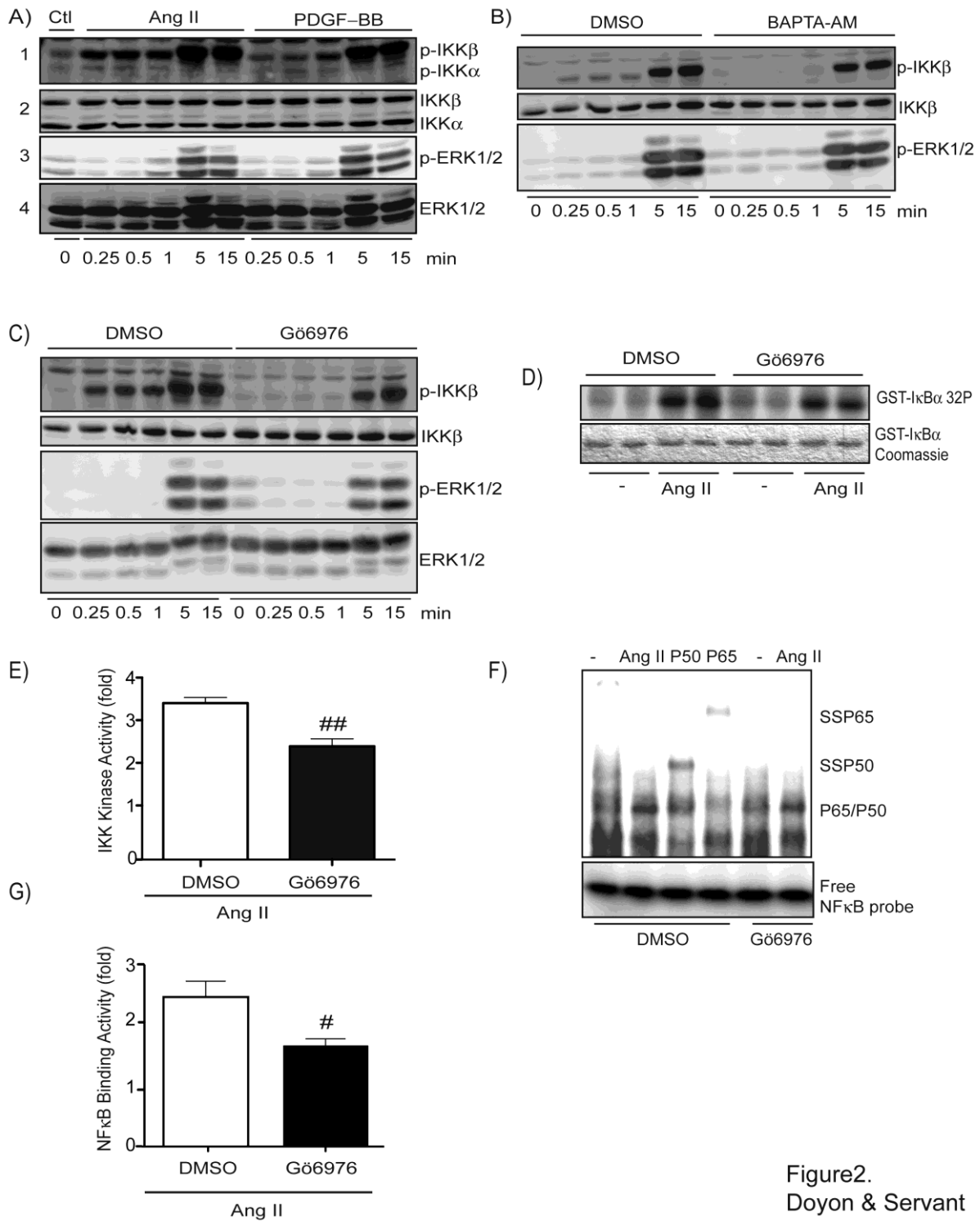


Figure2.  
Doyon & Servant



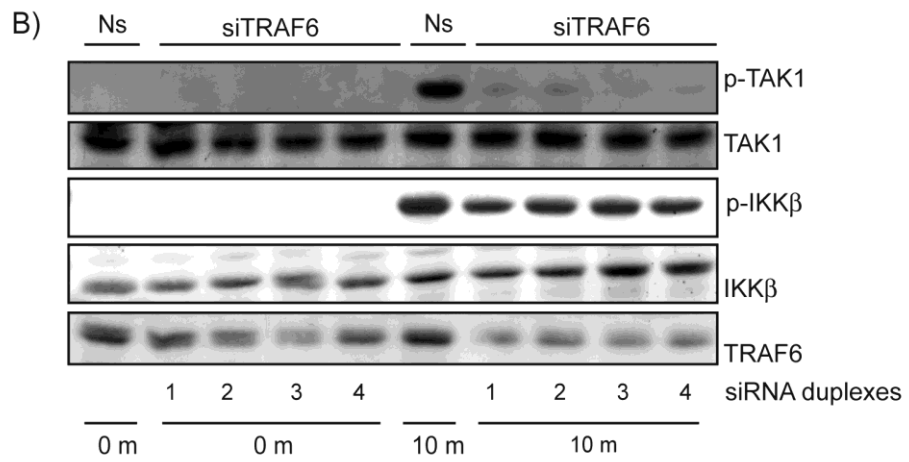
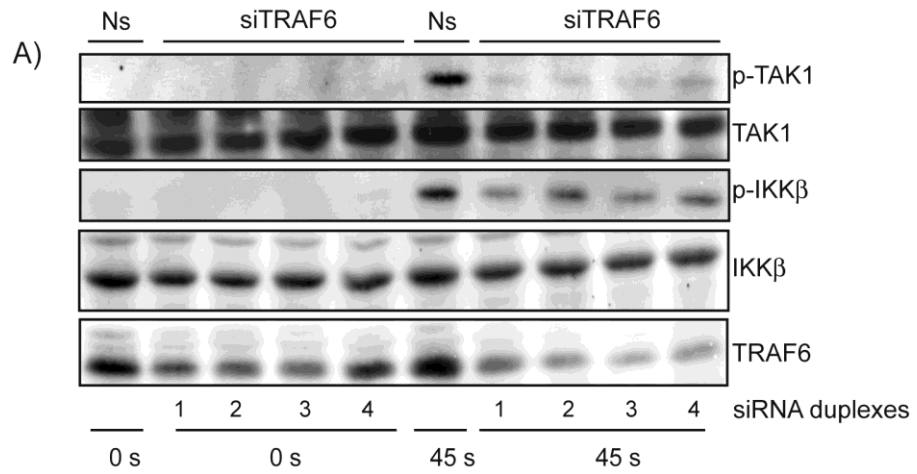


Figure3.  
Doyon & Servant

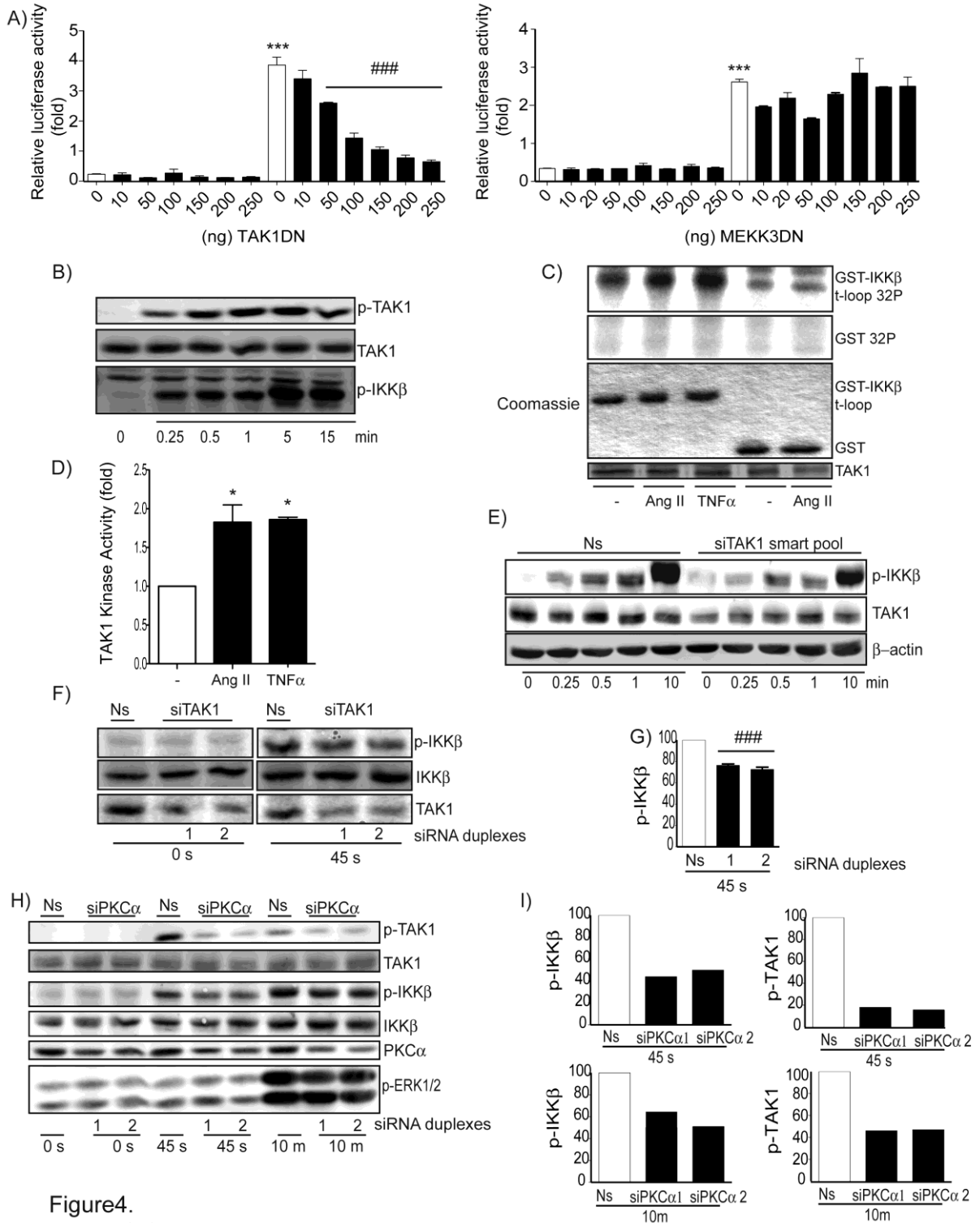


Figure 4.  
Doyon & Servant

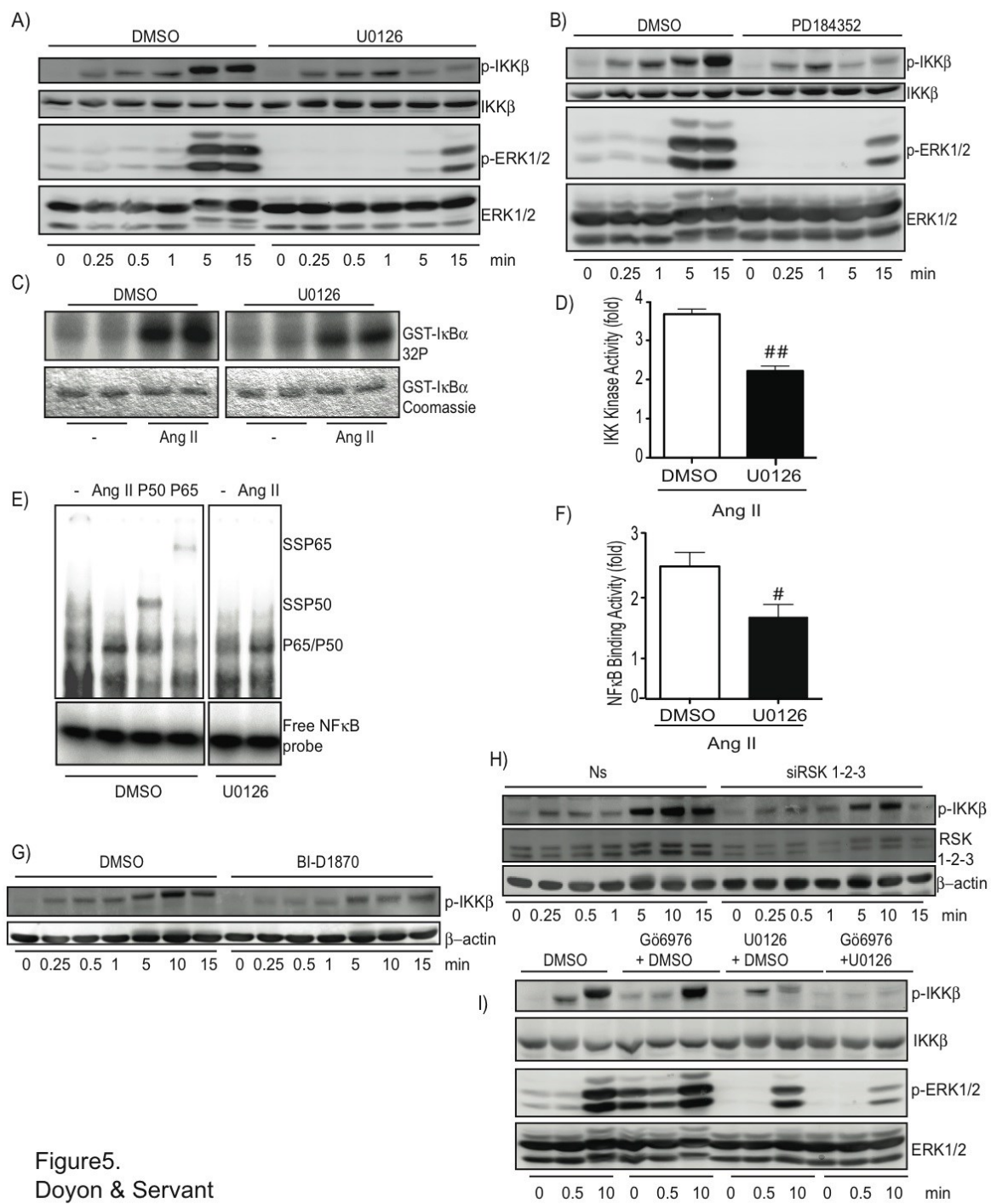


Figure 5.  
Doyon & Servant

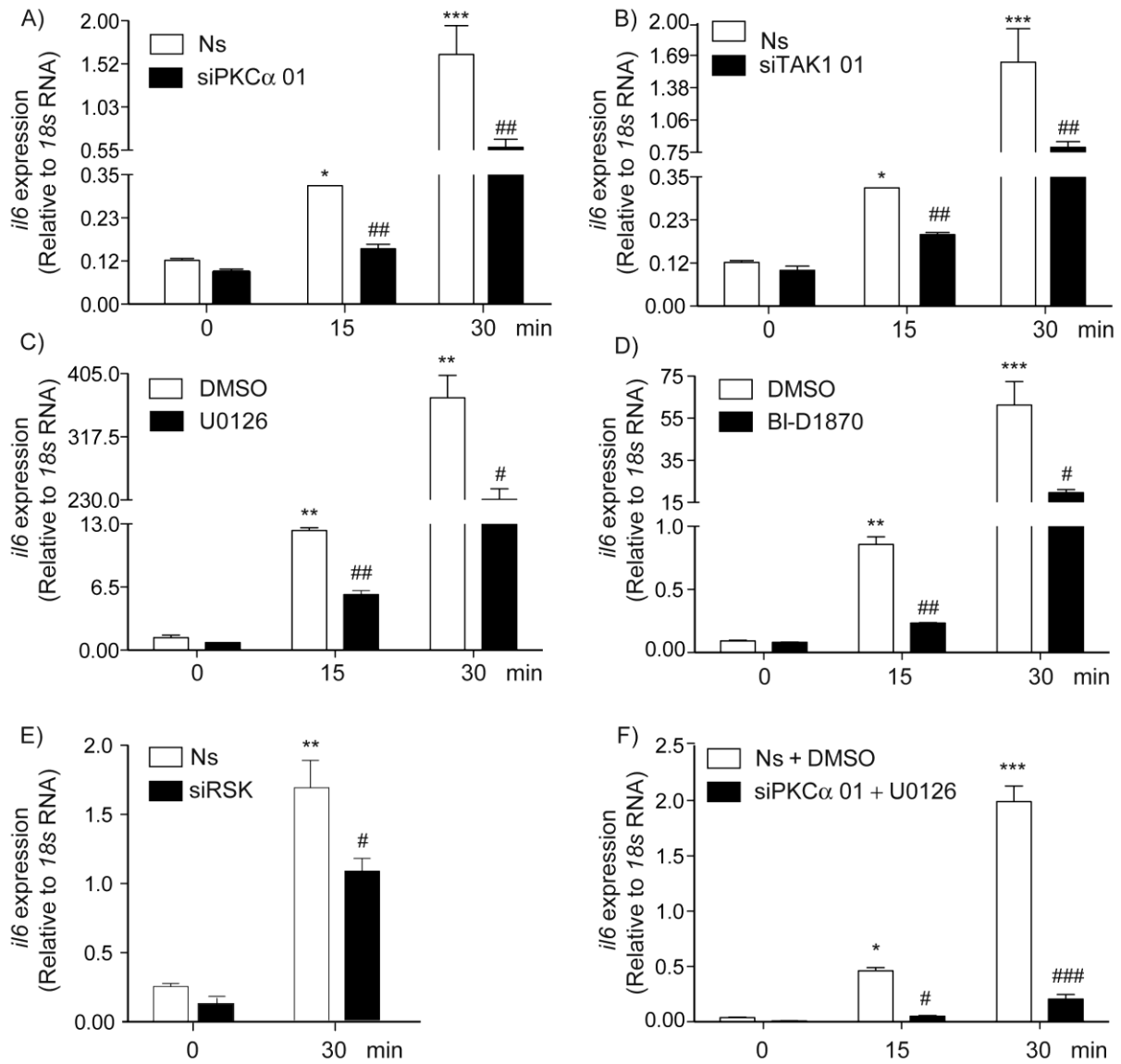


Figure6.  
Doyon & Servant

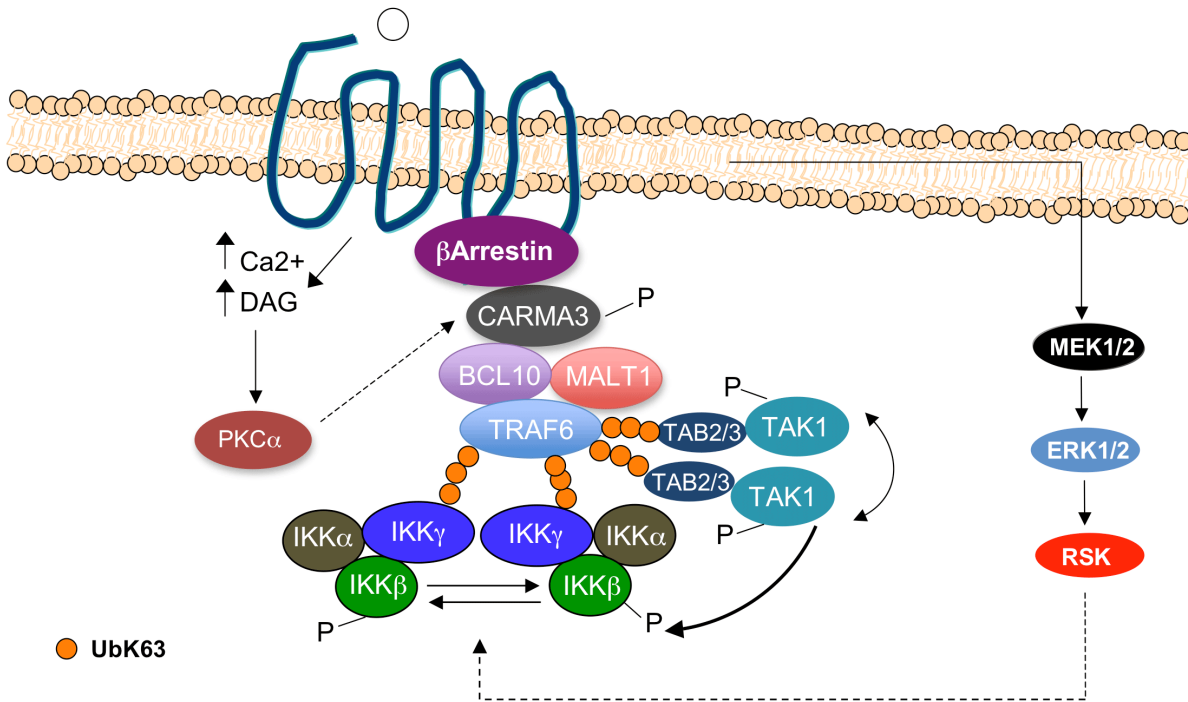
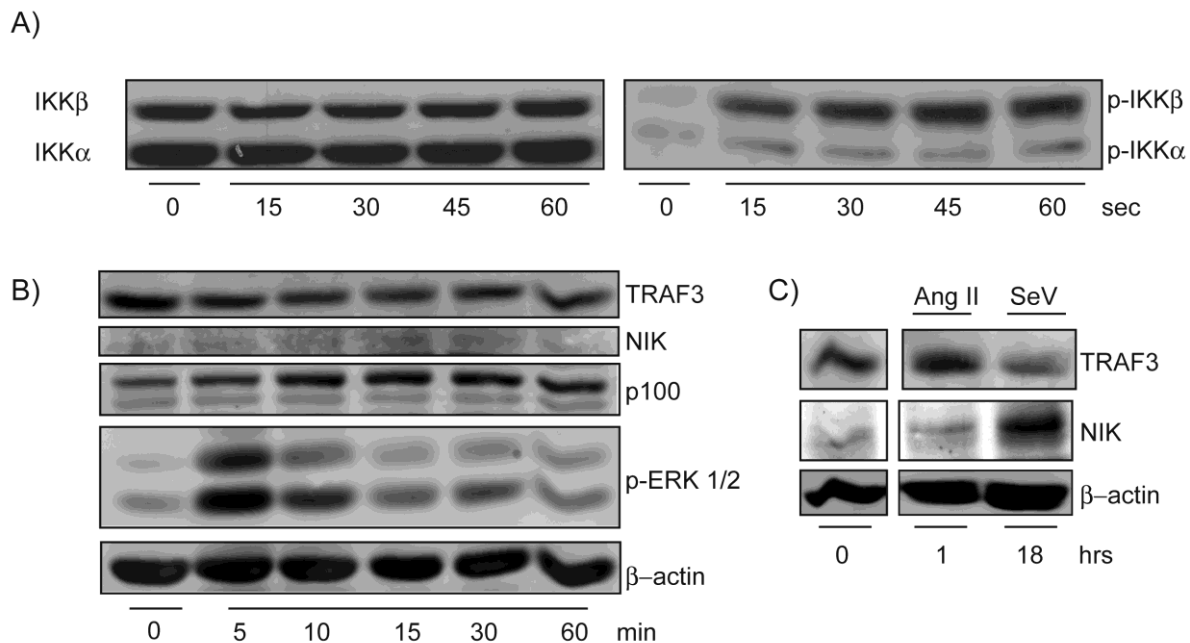


Figure7.  
Doyon&Servant



Supplemental Figure S1: No activation of the noncanonical pathway in VSMC exposed to Ang II. (A to C) Quiescent VSMCs were treated with Ang II (100 nM) for the indicated times. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis using indicated antibodies. In Fig. S1C, infection with Sendai virus (SeV) was used as a positive control to induce the degradation of TRAF3, which correlates with the increase expression level of NIK.

## 2.0 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

**Journal:** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

**Article accepté**

**Parution:** 17 octobre 2013

**Facteur d'impact 2013:** 6.338

**Titre:** Role of I $\kappa$ B kinase- $\beta$  in the growth-promoting effects of angiotensin II *In Vitro* and *In Vivo*.

**Auteur:** Priscilla Doyon\*, Wendy J. van Zuylen\*, Marc J. Servant

\* Ces auteurs ont contribué également à l'apport du travail.

**Directeur de recherche:** Marc J. Servant

**Apport :** Optimisation des protocoles *in vitro*, Résolution des problèmes *in vitro*, Contribution à la rédaction et à l'analyse des résultats.

**Résultats:** Figures. 1A-D, 2A-D, 3A-D, 4B-C et Supplemental Figure I. A, Figure II A

# **Role of the IKappaB Kinase-Beta in the Growth Promoting Effects of Angiotensin II *in vitro* and *in vivo***

Priscilla Doyon<sup>1\*</sup>, Wendy J. van Zuylen<sup>1\*</sup>, and Marc J. Servant<sup>1</sup>

<sup>1</sup> From the Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada  
\*These authors contributed equally to the study

*IKK $\beta$  is required for Angiotensin II-induced hypertrophy*

Correspondence to: Marc J. Servant, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, Tel. 514 343-7966;

Fax. 514 343-7073

Key Words: Angiotensin II, arterial vascular remodeling events, TSC1, protein synthesis, IKK $\beta$

Total word count: 6233

Number of figures and tables: 6 figures, 4 supplementary figures, 1 table



## **Abstract**

**Objective** - Angiotensin II (Ang II) is implicated in processes underlying the development of arterial wall remodeling events, including cellular hypertrophy and inflammation. We previously documented the activation of IKK $\beta$  Kinase-Beta (IKK $\beta$ ) in Ang II-treated cells, a kinase involved in inflammatory reactions. In light of a study suggesting a role of IKK $\beta$  in angiogenesis through its effect on the TSC1/2-mTORC1 pathway in cancer cells, we hypothesized that targeting IKK $\beta$  could reduce arterial remodeling events by affecting both the inflammatory and growth promoting response of Ang II.

**Approach and Results** – Treatment of aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) with Ang II induced the rapid and sustained phosphorylation of TSC1 on Ser511, which paralleled the activation of effectors of the mTORC1 pathway. Moreover, we show that Ser511 of TSC1 acted as a phosphoacceptor site for Ang II-activated IKK $\beta$ . Consistent with this, the use of different shRNA constructs targeting IKK $\beta$  reduced Ang II-induced TSC1, S6K and 4EBP1 phosphorylation and the rate of protein synthesis. Overexpression of TSC1 lacking Ser511 in VSMC also exerted detrimental effects on the hypertrophic effect of Ang II. Furthermore, the selective IKK $\beta$  inhibitor ML120B reduced the inflammatory response and dose-dependently diminished Ang II-induced TSC1 phosphorylation and effectors of the mTORC1 pathway leading to inhibition of protein synthesis *in vitro* and in rat arteries *in vivo*.

**Conclusions** - Our findings provide new insights into the molecular understanding of the pathological role of Ang II and assist to identify the beneficial effects of IKK $\beta$  inhibition for the treatment of cardiovascular diseases.

<b>Abbreviations</b>	
Ang II	Angiotensin II
IKKB	IKappaB Kinase-Beta
VSMC	Vascular smooth muscle cells
RAS	Renin angiotensin system
NF-κB	Nuclear factor kappa B
TSC	Tuberous sclerosis
MAP kinases	Mitogen-activated protein kinases
HASMC	Human aortic smooth muscle cell
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
AT1R	Ang II type I receptor
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
4E-BP1	Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1
S6K	S6 kinases

## Introduction

As the effector of the renin angiotensin system (RAS), the hormone Ang II plays a critical role in controlling cardiovascular homeostasis. Through binding to the Ang II receptor (AT1R or AT2R), it regulates salt/water homeostasis, vasoconstriction, and modulates cellular responses in a paracrine and autocrine fashion. However, deregulated production of Ang II in the vessel wall has been implicated in cardiovascular diseases associated with VSMC hypertrophy and inflammation, including hypertension and atherosclerosis (1-4). We and others have shown that this inflammatory response mediated by Ang II, involving nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) transcription factors, required activation of IKK $\beta$  in VSMC (5-7).

In the 'classical' NF- $\kappa$ B pathway, IKK $\beta$  forms the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex with IKK $\alpha$  and scaffold protein NEMO. In this complex, the IKK $\beta$  subunit can modulate the activity of the NF- $\kappa$ B pathway by phosphorylating I $\kappa$ B $\alpha$  at Ser32 and Ser36, which leads to its polyubiquitination and degradation resulting in release and nuclear accumulation of NF- $\kappa$ B to induce gene expression (8). Interestingly, in addition to I $\kappa$ B $\alpha$  many other substrates of IKK $\beta$  have been identified, including  $\beta$ -catenin (9), p65 (6), SRC-3 (10), FOXO3 $\alpha$  (11), CYLD (12), DOK1 (13), and more recently, tuberous sclerosis 1 (TSC1) (14).

The tumor suppressor gene TSC1 (hamartin) acts in a complex with TSC2 (tuberin) and prevents its ubiquitination and degradation (15). The hamartin-tuberin complex suppresses the activation of the small GTPase RHEB (ras homolog enriched in brain), via a GTPase-activating domain near the C-terminus of tuberin (16). Active GTP-bound RHEB activates the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), which results in phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and S6 kinases (S6K1 and S6K2) (17), to increase protein translation and cell growth. Hence, when functional hamartin or tuberin is lost, increased levels of active RHEB constitutively activate mTORC1, which in turn leads to increased cell growth.

Diverse environmental cues, including growth factors, energy status, oxygen and amino acids, promote mTORC1 signaling. Particularly in response to growth

factors (e.g. insulin, insulin-like growth factor 1, and epidermal growth factor), TSC2 is phosphorylated by several kinases, including AKT (on Ser939, Ser981, and Thr1462), extracellular signal-regulated kinases (ERK, on Ser664), and p90 ribosomal S6 kinase (p90RSK, on Ser1798), which leads to the inhibition of the GTPase-activating protein (GAP) function of TSC2 towards RHEB (18-19). Conversely, AMPK and GSK3 phosphorylation of TSC2 (on Ser1345 and Ser1341 plus Ser1337 respectively) positively regulates its GAP function towards RHEB (20). Interestingly, in cancer cells activated IKK $\beta$  was demonstrated to phosphorylate TSC1 on Ser511, which results in the inhibition of the TSC1-TSC2 complex and, consequently, the activation of mTORC1 leading to inflammation-mediated tumor angiogenesis (14).

In addition to mediating vascular inflammation (3,5), Ang II acts also as a growth factor that stimulates protein synthesis and induces cellular hypertrophy in VSMC (21). Via the AT1R, Ang II induces phosphorylation of tyrosine kinases, including c-Src, janus family kinases (JAK), focal adhesion kinase (FAK), PYK2, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) to stimulate cell growth (22-23). Additionally, Ang II activates mitogen-activated protein (MAP) kinases, including ERK1/2 and mTOR, which are both involved in the growth properties of the peptide (21-24). Despite these investigations, the molecular mechanisms by which Ang II mediates VSMC growth are not fully elucidated. We therefore hypothesized that Ang II-activated IKK $\beta$  is not only involved in the inflammatory response, but is also involved in the signal transduction underlying the hypertrophic response. Thus, the present study was undertaken to examine this possible new role of IKK $\beta$  in the phenotypic responses of VSMC.

## **Material and methods**

### **Materials**

Ang II was purchased from Sigma (Saint Louis, MO) and [3H]-Leucine from MP Biomedicals (Santa Ana, CA). The IKK $\beta$  inhibitor N-(6-chloro-7-methoxy-9H- $\beta$ -carbolin-8-yl)-2-methylnicotinamide (ML120B) was a kind gift from Millennium: The Takeda Oncology Company (Cambridge, MA). The MEK1/2 inhibitor UO126 was purchased from Calbiochem (Gibbstown, NJ). Both drug inhibitors were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -80C until used. Primary human aortic VSMC were obtained from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA) and cultured according to manufacturer recommendations. The pGEX6P-1-GST-TSC1 and pGEX6P-1-GST-TSC1(S511A) constructs were kindly donated by Dr. Mien-Chie Hung (University of Texas, HOU). pcDNA3.1 myc-TSC1 (#12133) was obtained from Dr. Cheryl Walker through Addgene and subcloned into the lentiviral bicistronic pLVX-IRES-Puro expression vector (Clontech). Mutation of Ser511 of TSC1 into Ala residue was accomplished using the QuikChange Lightning kit (Agilent Technologies). The commercial antibodies were purchased from the following suppliers: anti-IKK $\alpha/\beta$  (SC-7607) from Santa Cruz Biotechnology; phospho-mTOR (Ser2481, #2974), mTOR (#2983), phospho-S6K1 (Thr389, #9205), S6K1 (#2708), phospho-4EBP1 (Ser65, #9451), 4EBP1 (#9452), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204, #9101), and anti-ERK1/2 (#9102) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); phospho-TSC1 (Ser511), and TSC1 from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX); anti- $\beta$ -actin clone AC-74 (A5216) from Sigma (Saint Louis, MO).

### **Cell culture**

Primary human and rat aortic VSMC were cultured and synchronized in the quiescent state as described previously. (1,2) For experiments with pharmacological inhibitors, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated inhibitor concentrations for 30 min prior to addition of Ang II.

### **Preparation of cellular extracts and immunoblot analysis**

Accomplished as described previously (1,2). In some Western blot experiments, cellular extracts were equally divided ( $\mu\text{g}$ ) and used in parallel on the same SDS-gel. Briefly, VSMC were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and whole cell extracts were prepared using 1% Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% Na Deoxycholate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10<sup>-6</sup>M leupeptin, 10<sup>-6</sup>M pepstatin A, 10<sup>-6</sup>M aprotinin) for 30 min at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 13000 g for 10 min, and equal amounts of protein (30-60  $\mu\text{g}$ ) were subjected to electrophoresis on 10% or 12% acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris and 192 mM glycine. Immunoblot analysis for each antibody was carried out according to manufacturer's instructions.

### **In vitro Kinase assay**

The phosphotransferase activity of the IKK $\beta$  was measured as described previously (1). Briefly, quiescent VSMC were stimulated with Ang II for 0 or 10 min. 500  $\mu\text{g}$  of whole cell extracts were incubated for 4 h at 4 °C with a specific antibody to IKK $\beta$  (SC-7607) preabsorbed to protein A Sepharose beads. The immune complexes were washed twice with lysis buffer and twice with kinase buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM EGTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM p-nitrophenyl phosphate, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10<sup>-4</sup> M phenylmethylsulfonyl fluoride). IKK $\beta$  activity was assayed by resuspending the beads in 40  $\mu\text{l}$  of kinase buffer containing, 20  $\mu\text{M}$  ATP, 20  $\mu\text{Ci}$  of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and 2  $\mu\text{g}$  GST-IkBa (amino acids 1–54), 2  $\mu\text{g}$  GST-TSC1 (amino acids 501-610) or 2  $\mu\text{g}$  GST-TSC1 S511A (amino acids 501-610). The reactions were incubated at 30 °C for 60 min and stopped by the addition of 5X Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Following Coomassie staining, the gels were dried and exposed to a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences) for imaging and quantification.

## **Lentiviruses Production and Transduction**

The production and transduction of lentiviral particles were accomplished as described previously. (3) Briefly, 293T cells were transfected using lipofectamine 2000 with 1.5  $\mu\text{g}$  pMDLg/pRRE, 1.5  $\mu\text{g}$  pRSV-REV and 3  $\mu\text{g}$  pVSV-G as previously described 4 whether with 6  $\mu\text{g}$  of pLKO.1-puro encoding shRNA targeting IKK $\beta$  (TRCN0000018918 (#4) and TRCN0000018919 (#5)) or shRNA non-target (NT, Sigma), or with pLVX-IRES-puro encoding TSC1-Myc or TSC1 S511A-Myc. After 24 hours, mediums containing lentiviral particles were harvested and cellular debris removed by filtration (0.45  $\mu\text{m}$ ). For shRNA strategy, human aortic VSMC were infected at a MOI of 1.0 in complete medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of polybrene. After 16 hours, the medium was changed and two days after the cells were split in presence of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of puromycin. Four days later the cells were synchronized for 48 hours, stimulated and then harvested and analyzed by immunoblotting or used for [3H]-Leucine incorporation. For overexpression strategy, human aortic VSMC were directly overlaid with lentiviruses in complete medium containing 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of polybrene. After 16 hours, the medium was changed and 24 hours later the cells were synchronized 48 hours and then used in [3H]-Leucine incorporation assays.

## **Measurement of protein synthesis in vitro**

The rate of protein synthesis using [3H]-Leucine was measured as described previously (5). Briefly, quiescent rat VSMC in triplicate wells of 24-well plates were stimulated with 100 nM Ang II in serum-free medium containing 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [3H]-Leucine. After 24 h of stimulation, the medium was aspirated and the cells were incubated for 30 minutes in ice-cold 5% trichloroacetic acid. The wells were then washed once with 5% trichloroacetic acid and three times with ice-cold tap water. The radioactivity was measured by liquid scintillation counting after solubilization in 0.1 M NaOH. For experiments with pharmacological inhibitors, the cells were treated with the indicated inhibitor for 30 minutes and stimulated for 24 h in the continuous presence of the inhibitor.

## Measurement of protein synthesis in vivo

The rate of protein synthesis using [3H]-Leucine infusion in vivo was measured as described previously (6). Briefly, each male Sprague-Dawley rats weighing 275-300 g (Charles River Laboratories, QC, Canada) received an injection of buprenorphine (0.03 mg/kg s.c.) and were anesthetized with isoflurane (2-3%) for insertion of polyethylene catheter in the left femoral vein and artery. After surgery, each rat was housed in individual cage. Monitoring was performed regularly (each 120 minutes). A second dose of buprenorphine was administrated 12 hours after the beginning of the surgery. Rats were free to move and have access to food and water. Following the infusion of [3H]-Leucine, rats were euthanized with pentobarbital i.v. Prior to undertaking the studies described, approval for all experiments using rats was obtained from the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal (protocol #12-025) and was conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. To study Ang II-induced vascular protein synthesis, osmotic pumps (model 1003D Alzet) releasing a constant dose of Ang II (400 ng/kg per min) were implanted subcutaneously in two groups of animals (Ang II and Ang II plus ML120B, Figure 5). Two additional groups of animals did not receive Ang II (Control and ML120B only, Figure 5). The dosage of Ang II was selected from previous results demonstrating the induction of protein synthesis without affecting blood pressure (6). Rats were allowed to recover unrestrained and had free access to food and water. 22 h after the implantation of the osmotic pumps, a saline solution containing [3H]-Leucine was infused intravenously for the last 4 hours at a rate of 12  $\mu$ Ci/hour to allow quantification of protein synthesis. In addition, one hour before [3H]-Leucine infusion, two groups of animals (ML120B only and Ang II plus ML120B, Figure 5) received an intravenous bolus of 0.25 mg/kg ML120B suspended in 0.2% carboxymethyl cellulose (10  $\mu$ M plasma concentration), whereas the other two groups of animals (Control and Ang II, Figure 5)) received an intravenous bolus 0.2% carboxymethyl cellulose (vehicle). The arterial pressure and heart rate were recorded during drug administration and [3H]-Leucine infusion utilizing the arterial catheter in freely moving rats. At the end of the treatments, aorta and small mesenteric arteries (arteries branching from, but excluding the superior mesenteric artery) were harvested, free



from surrounding tissue, frozen, and powdered in liquid nitrogen. Tissues were solubilized in 1 M KOH at 45°C for 4 h. For each tissue, 5 µl was used to measure protein concentration and 500 µl to measure incorporation of [3H]-Leucine in newly synthesized proteins by liquid scintillation counting. Data are expressed as counts per minute per milligram of protein, which represents the rate of vascular protein synthesis over a 4 hours-period. For immunoblot analysis, tissue extracts were prepared using 1% Triton X-100 lysis buffer containing 0.1 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10<sup>-6</sup>M leupeptin, 10<sup>-6</sup>M pepstatin A, and 10<sup>-6</sup>M aprotinin.

### **Statistical analysis**

In vitro and in vivo data are expressed as mean +/- SD and SEM respectively. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparison of two groups was carried out using a two-tailed unpaired t test, and comparison of more than two groups was carried out with one-way analysis of variance and a Bonferroni post-test. Statistical significance was accepted at a p value below 0.05. The number of independent experiments is denoted by n.

### **References Material and methods**

1. Doyon P, Servant MJ. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal s6 kinase intracellular pathways link the angiotensin ii at1 receptor to the phosphorylation and activation of the ikappab kinase complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2010;285:30708-30718
2. Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Chenard V, Moreau P, Servant MJ. The proinflammatory actions of angiotensin ii are dependent on p65 phosphorylation by the ikappab kinase complex. *J Biol Chem.* 2006;281:13275-13284
3. van Zuylen WJ, Doyon P, Clement JF, Khan KA, D'Ambrosio LM, Do F, St-Amant-Verret M, Wissanji T, Emery G, Gingras AC, Meloche S, Servant MJ. Proteomic profiling of the traf3 interactome network reveals a new role for the er-to-golgi transport compartments in innate immunity. *PLoS pathogens.* 2012;8:e1002747

4. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998;72:8463-8471
5. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective mek inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:16047-16052
6. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P. Signaling of angiotensin ii-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord.* 2004;4:6

## Results

***Angiotensin II induces the phosphorylation of TSC1 at Ser511, which parallels the activation of mTORC1 effectors.*** - We first interrogated whether Ang II had the ability to induce the phosphorylation of TSC1 on Ser511, a proposed IKK $\beta$  consensus site (14). Using primary human aortic VSMC exposed to Ang II, we detected a significant increase in the Ser511 phospho-signal (Figures 1A and 1B). This signal occurred rapidly, was sustained and importantly, correlated with the presence of the mTOR Ser2481 phospho-signal, which directly monitors intrinsic mTORC-specific catalytic activity (25). We therefore investigated whether the observed increase in the phosphorylation of TSC1 at Ser511 and mTOR activation correlated with activation of mTORC1 effectors, namely S6K1 and 4E-BP1. As previously reported (26,27) an increase in the phospho-signal of S6K1 at Thr389 [pS6K1(T389)] and 4E-BP1 at Ser65 [p4E-BP1(S65)], upon addition of Ang II was observed (Figures 1C and 1D). Interestingly, these perfectly paralleled phosphorylation of TSC1 at Ser511. Similar results were obtained in quiescent rat aortic smooth muscle cells stimulated with Ang II (not shown). Altogether, these results suggest a possible role of IKK $\beta$  in the control of effectors controlling the translational machinery.

***IKK $\beta$  is required for the phosphorylation of TSC1 on Ser511 and activation of mTORC1 effectors in Ang II treated VSMC.***- We have previously demonstrated that Ang II induces a rapid and sustained activation of IKK $\beta$  in primary VSMC (5). Consequently, we next assessed its phosphotransferase activity towards recombinant TSC1 using an in vitro kinase assay. We observed that IKK $\beta$  strongly phosphorylated TSC1 upon Ang II activation. This phosphorylation signal was similar in intensity to that of I $\kappa$ B $\alpha$  the canonical substrate of IKK $\beta$ . Interestingly, IKK $\beta$  was no longer able to induce the phosphorylation of TSC1 when the IKK $\beta$  consensus site (Ser511) was mutated to an alanine residue (Figures 2A and B). Next, we examined the requirement of IKK $\beta$  in the Ang II-induced phosphorylation of TSC1 and mTORC1 effectors in primary cultured human VSMC. Reducing the expression level of IKK $\beta$  with two different shRNA constructs significantly affected the ability of Ang II to induce the phosphorylation of TSC1 at Ser511 as well as phosphorylation of S6K1 and 4E-BP1 (Figures 2C and 2D). Taken together these results demonstrate the requirement of IKK $\beta$  in the phosphorylation of TSC1 at Ser511 and the activation of the mTORC1 pathway in response to Ang II.

***Inhibition of Ang II-induced activation of the mTORC1 pathway by ML120B***- In addition to the shRNA knockdown approach, we next utilized a pharmacological approach. N-(6-chloro-7-methoxy-9H- $\beta$ -carbolin-8-yl)-2-methylnicotinamide (ML120B) is a potent and selective ATP-competitive inhibitor of IKK $\beta$ . ML120B has been reported to inhibit TNF $\alpha$ -induced nuclear translocation of p65 and inhibit the growth of multiple myeloma cells in vitro and in vivo (28,29) ML120B was also shown to inhibit LPS-induced TNF $\alpha$  production in vivo, and reduce inflammation and bone destruction in a rodent model of arthritis (30,31) . In our hands, this inhibitor was indeed very potent in inhibiting NF- $\kappa$ B activation as it antagonized TNF $\alpha$  induced I $\kappa$ B $\alpha$  degradation with maximal efficacy occurring at 30  $\mu$ M in human aortic VSMC (Supplemental Figure IA). Importantly, this concentration also blunts the ability of Ang II to induce the expression of the inflammatory marker VCAM-1 in cultured VSMC (Supplemental Figure IB). This inhibitor was used next to investigate the involvement of IKK $\beta$  in Ang II-induced hypertrophy. Quiescent human

aortic VSMC were incubated with ML120B added at a dose range from 3  $\mu$ M to 70  $\mu$ M before stimulating with Ang II. Interestingly, inhibition of IKK $\beta$  with increased amounts of ML120B correlated with a reduction of Ang II-induced phosphorylation of TSC1 on Ser511 as well as the autophosphorylation of mTOR and phosphorylation of the downstream mTORC1 effectors S6K1 and 4E-BP1 (Figure 3). Similar results were obtained in rat aortic VSMC stimulated with Ang II (Supplemental Figure IIA). The effect of the specific IKK $\beta$  inhibitor was also tested upon Ang II stimulation over a time-course. Pre-treatment with 30  $\mu$ M ML120B compromised the ability of Ang II to activate S6K1 and inhibit 4E-BP1 at all-time points examined, whereas Ang II-induced ERK1/2 phosphorylation [pERK1/2(T185/Y187)] was not (Supplemental Figure IIB). Thus, the kinase activity of IKK $\beta$  is required for Ang II to stimulate effectors of the translational machinery.

***The IKK $\beta$ -TSC1 signaling cascade is required for the hypertrophic effect of Ang II in VSMC-*** We next addressed the role of IKK $\beta$  and TSC1 in the ability of Ang II to increase the rate of protein synthesis in cultured VSMC. Importantly, use of the IKK $\beta$  inhibitor ML120B was found to concentration-dependently inhibit Ang II-induced protein synthesis with an IC<sub>50</sub> of 10,6  $\mu$ M (Figure 4A). It is noteworthy that this concentration also abolished ~50% of the quantified TSC1 and S6K1 phosphorylation (Figures 3B and 3D). Consistent with the effect of the pharmacological inhibitor, reduction of the expression level of IKK $\beta$  with distinct shRNA constructs in quiescent primary human VSMC inhibited Ang II-induced protein synthesis (Figure 4B). Same observation was made in rat VSMC exposed to two different siRNA duplexes targeting IKK $\beta$  (data not shown). Remarkably, this remodeling event is likely under the specific control of IKK $\beta$  over the growth suppressor gene TSC1. Indeed, whereas transient overexpression of TSC1wt had only marginal effect on the ability of Ang II to induce [3H]-Leucine incorporation, the use of a mutant form of TSC1 (S511A) lacking the IKK $\beta$  consensus site (and therefore not phosphorylated by IKK $\beta$ , see Figure 2A) severely compromised the hypertrophic effect of Ang II (Figure 4C). On the other hand, expression of the NF- $\kappa$ B super-repressor (I $\kappa$ B $\alpha$ -2Ndelta4) (32) in VSMC, which was previously shown by our

group to abrogate Ang II-induced NF- $\kappa$ B activation and expression of MCP-1 and IL-6 (6), did not alter the trophic effect of the peptide (Supplemental Figure III). Taken together, our results demonstrate that both the kinase activity of IKK $\beta$  and the phosphorylation of TSC1 at Ser511 are required for the activation of effectors of the translational machinery and the hypertrophic effect of Ang II.

**Additive effect of ML120B and UO126 on Ang II-stimulated protein synthesis-** We have previously shown that activation of the MEK1/2-ERK1/2 pathway is necessary but not sufficient for the hypertrophic effects of Ang II in VSMC (21). Accordingly, the relative contribution of the ERK1/2 pathway and IKK $\beta$  to the regulation of protein synthesis was next examined. Simultaneous treatment of quiescent VSMC with ML120B and MEK1/2 inhibitor UO126 had an additive effect on the inhibition of Ang II-induced protein synthesis compared to the effect of each drug alone (Supplemental Figure IV). These results suggest that ERK1/2 and IKK $\beta$  act via distinct pathways to increase the rate of protein synthesis in VSMC in response to Ang II.

**Inhibition of IKK $\beta$  reduces Ang II-induced protein synthesis in vivo-** As the effect of ML120B on Ang II signaling events was identical in both cultured human and rat VSMC (Figures 3 and Supplemental Figure II), we were therefore well positioned to next investigate the role of IKK $\beta$  in Ang II-induced hypertrophy in vivo utilizing a previously reported rat model that allows the measurement of vascular protein synthesis (24, 33). Whereas the dose of Ang II used in this protocol do not affect the mean blood pressure (MBP) (see Table I), it clearly induces vascular remodeling as observed by the enhanced the rate of protein synthesis in rat aorta and rat mesenteric arteries (Figures 5A and B). It is worth mentioning that inhibition of IKK $\beta$  with ML120B resulted in an important reduction in the remodeling effect of the peptide without affecting the MBP, ruling out an indirect effect of this hemodynamic parameter. As expected, the use of the IKKB inhibitor also reduced Ang II-induced VCAM-1 expression in aorta (Figures 5C and D). Taken together, these results

demonstrate the physiological relevance of IKK $\beta$  requirement in both inflammatory and hypertrophic actions of Ang II.

## Discussion

The vascular wall is an active organ, which consists of endothelial cells, VSMC, and fibroblasts. In the intact arterial media, VSMC and matrix are responsible for vessel wall contraction-relaxation, growth, development, remodeling, and repair whereas abnormal growth of VSMC plays a major role in the development of vascular diseases, including hypertension and atherosclerosis (3,4). Deregulated production of the octapeptide Ang II mediates VSMC hypertrophy and inflammation (2,34). Therefore, understanding the signal transduction processes underlying Ang II-mediated cell growth is essential for identifying new therapeutic strategies to combat vascular diseases.

Previous studies have identified two major signaling cascades that are directly linked to Ang II-mediated protein synthesis in VSMC (see Figure 6, right side). Selectively blocking MEK1 and MEK2 by PD98059, and consequently ERK1/2 and MNK1 reduced Ang II-induced protein synthesis in VSMC and rat aorta (21,33,35) implicating the Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-MNK1 signaling cascade in the increase rate of protein translation. Through the effect on TSC2, other studies also suggest that the ERK substrate MAPKAP kinase p90RSK is also required for full mTOR activation. (36,37) The other major signaling cascade is the PI3K-PDK1-AKT module. Treatment of human SMC with PI3K inhibitor wortmannin reduced both Ang II-mediated protein synthesis and dissociation of 4E-BP1 with eIF4E (26), whereas expression of a dominant-negative mutant of AKT in VSMC reduced Ang II-induced protein synthesis (38). Interestingly, reactive oxygen species generation by Ang II also leads to the activation of AKT in a PDK1 and p38-dependent mechanism (39). Therefore, in addition to activation of MEK1/2-ERK1/2 modules, the PI3K-AKT cascade is involved in Ang II-mediated protein synthesis in VSMC. Despite these detailed investigations, the molecular mechanisms by which Ang II mediates VSMC growth are not fully elucidated. In the present study we examined the involvement of

IKK $\beta$  in Ang II-induced VSMC growth. We have previously reported that Ang II induces TRAF6-TAK1 and ERK1/2-RSK intracellular pathways, independently and sequentially, which lead to T-loop phosphorylation of IKK $\beta$  (5). This phosphorylation of IKK $\beta$  was observed as early as 15 second and plateaued within 5 to 10 minutes. Here we demonstrate that upon Ang II treatment, the detected phospho-signal of TSC1 at the IKK $\beta$  consensus site Ser511 increased after 5 min of stimulation, suggesting that IKK $\beta$  acts upstream of TSC1 (Figure 1A). Supporting this proposition is the fact that IKK $\beta$  was no longer able to phosphorylate a recombinant TSC1 lacking the IKK $\beta$  consensus site (Figure 2A). In addition, reducing the expression level of IKK $\beta$  by the use of shRNA or blocking its phosphotransferase activity, using ML120B, significantly reduced the phospho-signal of TSC1 on Ser511 (Figures 2C, 3A, 3B and Supplemental Figure II). These results indicate that IKK $\beta$  phosphorylates TSC1 on Ser511 in response to Ang II in primary rat and human VSMC.

Ang II modulates the expression of proinflammatory molecules in the vessel wall, such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), which stimulates recruitment of mononuclear leucocytes into the vessel media (40). In VSMC, the IKK $\beta$  inhibitor ML120B abrogated this Ang II-induced VCAM-1 expression (Supplemental Figure IB). Interestingly, ML120B also dose-dependently reduced Ang II-induced autophosphorylation of mTOR (Figures 3A and 3B) and downstream effectors of the mTORC1 pathway (Figures 3C and 3D). In fact, at the maximal concentration of 30  $\mu$ M, ML120B totally prevented mTOR activation and dramatically affected S6K1 and 4E-BP1 phosphorylation, correlating with a novel function of IKK $\beta$  in the hypertrophic effect of Ang II (Figures 4A and B). Mechanistically, treatment with the MEK inhibitor UO126 plus ML120B had an additive effect on the inhibition of Ang II-induced protein synthesis (Supplemental Figure IV) strengthening the hypothesis that Ang II-activated IKK $\beta$  increases the rate of protein synthesis mainly via a MEK1/2-ERK1/2-MNK1 independent pathway. The inhibitory behavior of the mutant of TSC1 lacking the IKK $\beta$  consensus site (TSC1 S511A) in human VSMC (Figure 4C) further demonstrates the importance of the IKK $\beta$ -TSC1 signaling module governing the hypertrophic effect of Ang II (see Figure 6, left side). We would like to assert that this novel signaling module does not necessary lessen the contribution of previously characterized

signaling cascades or second messenger molecules involved in the growth properties of Ang II. Rather, as observed for the generation of reactive oxygen species (ROS) and protein kinases such as c-Src, which were previously shown to be part of upstream signaling cascades governing the activation of IKK $\beta$  (41), we propose that specific vascular hypertrophic signaling pathways engaged by the AT1R (e.g. c-Src, generation of ROS) might as well converge to the activation of IKK $\beta$ . Another scenario could also be considered where phosphorylation of TSC2 by the AKT and ERK1/2 pathways is involved but not sufficient to fully activate mTOR and increase the rate of protein synthesis in Ang II-treated cells. Notably, whereas TSC2 phosphorylation by ERK1/2 and AKT is proposed to inhibit its GAP function towards RHEB (18,19) phosphorylation of TSC1 on Ser511 was recently shown to be an upstream signaling event affecting its association with TSC2, altering TSC2 membrane localization and activation the mTOR pathway 14.

In our *in vivo* studies, the IKK $\beta$  inhibitor ML120B was administered as an intravenous (iv) bolus to deliver a precise dose of ML120B into the vascular system. Since the pharmacokinetic profile of ML120B upon iv administration was unknown, the dosage was selected from previous reports demonstrating that ML120B at a plasma concentration of 10  $\mu$ M is effective at inhibiting IKK $\beta$ -dependent NF- $\kappa$ B activation *in vivo* (28). IKK $\beta$  inhibition at this concentration was confirmed by the observation that Ang II-mediated VCAM-1 expression was reduced in aorta (Figures 5C and D). More importantly, IKK $\beta$  inhibition clearly reduced the rate of protein synthesis mediated by Ang II in both aorta and mesenteric vessels (Figures 5A and B). Taken together, the presented pharmacological and molecular data are most consistent with the involvement of IKK $\beta$  in the ability of Ang II to suppress the mTOR inhibitor TSC1 leading to activation of S6K1 and inhibition of 4E-BP1 and resulting in increased protein synthesis.

A previous study identified a link between the innate immune protein kinase IKK $\beta$  and TSC1 in cancer cells, which was proposed to be critical for inflammation-mediated tumor angiogenesis (14). However this study did not address whether this molecular link could become a potential target in cardiovascular diseases involving cellular processes associated with both growth and inflammatory events. Our study



goes further to suggest that IKK $\beta$  is not only responsible for coupling the AT1R to the activation of NF-KB transcription factors leading to a proinflammatory response (5,6) but also to the direct activation of the mTORC1 pathway. We therefore propose that IKKB could become an attractive target for drug development to treat pathological conditions including hypertension and atherosclerosis.

### **Acknowledgements**

We thank Dr Céline Bouvet for her dedicated technical assistance. We are grateful to Drs Pierre Moreau, Denis deBlois (Faculty of Pharmacy, UdeM) and Dr Philippe Roux (IRIC, UdeM) for reagents used in this study and for helpful discussions. We also thank Millennium Pharmaceuticals (Dr. Peter G Smith) for sharing ML120B.

### **Source of fundings**

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-53282) and the Heart and Stroke Foundation of Canada to M.J.S. M.J.S. is the recipient of a Canada Research Chair in Inflammatory Response Signaling. P.D. is supported by studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and W.vZ. received a fellowship from the Société québécoise d'hypertension artérielle (SQHA).

### **Disclosures**

None declared

## References

1. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin ii cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C82-97
2. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, Montezano A, Touyz RM. Angiotensin ii and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e11
3. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in pharmacological sciences.* 2008;29:367-374
4. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annual review of physiology.* 2012;74:13-40
5. Doyon P, Servant MJ. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal s6 kinase intracellular pathways link the angiotensin ii at1 receptor to the phosphorylation and activation of the ikappab kinase complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2010;285:30708-30718
6. Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Chenard V, Moreau P, Servant MJ. The proinflammatory actions of angiotensin ii are dependent on p65 phosphorylation by the ikappab kinase complex. *J Biol Chem.* 2006;281:13275-13284
7. Zhang L, Cheng J, Ma Y, Thomas W, Zhang J, Du J. Dual pathways for nuclear factor kappab activation by angiotensin ii in vascular smooth muscle: Phosphorylation of p65 by ikappab kinase and ribosomal kinase. *Circ Res.* 2005;97:975-982
8. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of nf-kappab transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:693-733
9. Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, Verma U, Verma IM, Byers S, Gaynor RB. Regulation of beta-catenin function by the ikappab kinases. *J Biol Chem.* 2001;276:42276-42286
10. Wu RC, Qin J, Hashimoto Y, Wong J, Xu J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Regulation of src-3 (pcip/actr/aib-1/rac-3/tram-1) coactivator activity by i kappa b kinase. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3549-3561

11. Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung MC. Ikappab kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead foxo3a. *Cell*. 2004;117:225-237
12. Reiley W, Zhang M, Wu X, Granger E, Sun SC. Regulation of the deubiquitinating enzyme cyld by ikappab kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:3886-3895
13. Lee S, Andrieu C, Saltel F, Destaing O, Auclair J, Pouchkine V, Michelon J, Salaun B, Kobayashi R, Jurdic P, Kieff ED, Sylla BS. Ikappab kinase beta phosphorylates dok1 serines in response to tnf, il-1, or gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17416-17421
14. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. Ikk beta suppression of tsc1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mtor pathway. *Cell*. 2007;130:440-455
15. Benvenuto G, Li S, Brown SJ, Braverman R, Vass WC, Cheadle JP, Halley DJ, Sampson JR, Wienecke R, DeClue JE. The tuberous sclerosis-1 (tsc1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the tsc2 product tuberlin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*. 2000;19:6306-6316
16. Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. Insulin activation of rheb, a mediator of mtor/s6k/4e-bp signaling, is inhibited by tsc1 and 2. *Mol Cell*. 2003;11:1457-1466
17. Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mtor: Lessons from mtor inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:433-439
18. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. Tsc2 is phosphorylated and inhibited by akt and suppresses mtor signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4:648-657
19. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of tsc2 by erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. 2005;121:179-193
20. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO,

- Guan KL. Tsc2 integrates wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by ampk and gsk3 to regulate cell growth. *Cell*. 2006;126:955-968
21. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective mek inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271:16047-16052
22. Leduc I, Haddad P, Giasson E, Meloche S. Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin ii on aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1995;48:582-592
23. Pelletier S, Duhamel F, Coulombe P, Popoff MR, Meloche S. Rho family gtpases are required for activation of jak/stat signaling by g protein-coupled receptors. *Mol Cell Biol*. 2003;23:1316-1333
24. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P. Signaling of angiotensin ii-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord*. 2004;4:6
25. Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, Tee AR, Fingar DC. Mtor ser-2481 autophosphorylation monitors mtorc-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem*. 2010;285:7866-7879
26. Hafizi S, Wang X, Chester AH, Yacoub MH, Proud CG. Ang ii activates effectors of mtor via pi3-k signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1232-1238
27. Giasson E, Meloche S. Role of p70 s6 protein kinase in angiotensin ii-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995;270:5225-5231
28. Nagashima K, Sasseville VG, Wen D, Bielecki A, Yang H, Simpson C, Grant E, Hepperle M, Harriman G, Jaffee B, Ocain T, Xu Y, Fraser CC. Rapid tnfr1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of ikkbeta. *Blood*. 2006;107:4266-4273
29. Hideshima T, Neri P, Tassone P, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Dang L, Munshi N, Richardson P, Schenkein D, Anderson KC. Mln120b, a novel ikappab kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5887-5894

30. Schopf L, Savinainen A, Anderson K, Kujawa J, DuPont M, Silva M, Siebert E, Chandra S, Morgan J, Gangurde P, Wen D, Lane J, Xu Y, Hepperle M, Harriman G, Ocain T, Jaffee B. Ikkbeta inhibition protects against bone and cartilage destruction in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3163-3173
31. Izmailova ES, Paz N, Alencar H, Chun M, Schopf L, Hepperle M, Lane JH, Harriman G, Xu Y, Ocain T, Weissleder R, Mahmood U, Healy AM, Jaffee B. Use of molecular imaging to quantify response to ikk-2 inhibitor treatment in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:117-128
32. Kwon H, Pelletier N, DeLuca C, Genin P, Cisternas S, Lin R, Wainberg MA, Hiscott J. Inducible expression of ikappabalpha repressor mutants interferes with nf-kappab activity and hiv-1 replication in jurkat t cells. *J Biol Chem.* 1998;273:7431-7440
33. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: Role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension.* 2002;39:16-21
34. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews.* 2006;86:747-803
35. Ishida M, Ishida T, Nakashima H, Miho N, Miyagawa K, Chayama K, Oshima T, Kambe M, Yoshizumi M. Mnk1 is required for angiotensin ii-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2003;93:1218-1224
36. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal s6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13489-13494
37. Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP. The rsk factors of activating the ras/mapk signaling cascade. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2008;13:4258-4275
38. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of akt/protein kinase b by angiotensin ii in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1999;274:22699-22704
39. Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexander RW, Griendling KK. Role of p38 mapk and mapkapk-2 in angiotensin

ii-induced akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C494-499

40. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin ii stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappab activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:645-651

41. Storz P, Toker A. Protein kinase d mediates a stress-induced nf-kappab activation and survival pathway. *The EMBO journal.* 2003;22:109-120

## **Significance**

The octapeptide angiotensin II (Ang II) has been implicated in cellular processes underlying the development and progression of vascular diseases such as vascular smooth muscle cell (VSMC) inflammation and hypertrophy. Understanding the signal transduction processes involved in Ang II-mediated cell growth and inflammation is essential for identifying new therapeutic targets. Through the use of molecular and selective pharmacological approaches in vitro and in vivo, we here uncovered an essential role of the innate immune protein kinase IKK $\beta$  in Ang II-induced cellular hypertrophy. Mechanistically, this occur through the direct phosphorylation of the tumor suppressor gene TSC1 leading to activation of effectors of the mTOR pathway. The interesting molecular positioning of IKK $\beta$  in the proinflammatory actions and growth promoting properties of Ang II make this protein kinase an ideal candidate for future validation studies.

## Figure Legends

**Figure 1. Activation of mTORC1 effectors parallels the phosphorylation of TSC1 on Ser511. A and C)** Quiescent human aortic VSMC were stimulated with 100 nM Ang II over the indicated time-course. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. **B and D)** Densitometric analysis of the data presented in panels A and C respectively. Data are mean  $\pm$  S.D. of the three pooled experiments. \*, significantly above corresponding conditions without Ang II treatment; a single symbol indicates  $p < 0.05$ , two symbols indicate  $P < 0.01$ , and three symbols indicate  $p < 0.001$ .

**Figure 2. IKK $\beta$  is required for the phosphorylation of TSC1 on Ser511 and activation of effectors of the mTORC1 pathway. A)** Quiescent rat VSMC were treated with Ang II (100 nM) for 10 min. The phosphotransferase activity of IKK $\beta$  ( $^{32}\text{P}\gamma\text{-ATP}$ ) was measured on whole cell extracts by immune complex kinase assay using GST-I $\kappa$ B $\alpha$ , GST-TSC1 or GST-TSC1 S511A as *in vitro* substrates as indicated. For immunoblotting (IKK $\beta$ ) the upper part of the gel was probed with an IKK $\beta$  antibody to confirm equal amounts of the immunoprecipitated kinase. For Coomassie staining, the lower part of the gel was stained with Coomassie before drying to verify equal amounts of substrate. One of two independent experiments with similar results is shown. **B)** Densitometric analysis of IKK $\beta$  phosphotransferase activity presented in panel A. Data are mean  $\pm$  S.D. of the two pooled experiments. \*\*, significantly below corresponding conditions using GST-TSC1;  $p < 0.01$ . **C)** Human aortic VSMC were infected with lentiviral vectors encoding shRNA targeting IKK $\beta$  or non-targeting (NT) control shRNA followed by puromycin selection for 4 days. Cells were serum-starved for 48 hours before being left untreated or stimulated with Ang II (100 nM) for 10 minutes. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis with indicated antibodies. One of two independent experiments with similar results is shown. **D)** Densitometric analysis of the data presented in the right panel C. Data are mean  $\pm$

S.D. of the two pooled experiments. \*, significantly below the corresponding NT condition; a single symbol indicates  $p < 0.05$ , two symbols indicate  $P < 0.01$ .

**Figure 3. ML120B inhibits the Ang II-induced activation of effectors of the mTOR pathway. A and C)** Quiescent human aortic VSMC were pretreated for 30 min with vehicle (DMSO) or increasing concentrations of ML120B. The cells were then stimulated with Ang II (100 nM) for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown. **B and D)** Densitometric analysis of the data presented in panels A and C respectively. Data are mean  $\pm$  S.D. of the three pooled experiments. \*, significantly above conditions without Ang II treatment; a single symbol indicates  $p < 0.05$ , two symbols indicate  $P < 0.01$ , and three symbols indicate  $p < 0.001$ .

**Figure 4. Role of the IKK $\beta$ -TSC1 signaling cascade in Ang II-induced protein synthesis. A)** Quiescent rat VSMC were pretreated for 30 min with vehicle alone or increasing concentrations of ML120B. The cells were then stimulated for 24 h with Ang II in the continuous presence of ML120B. Protein synthesis was measured by [ $^3$ H]-Leucine incorporation. Data are combined from three independent experiments and are displayed as mean  $\pm$  SD. **B)** Human aortic VSMC were infected with lentiviral vectors encoding shRNA targeting IKK $\beta$  or non-targeting (NT) control shRNA followed by puromycin selection for 4 days. Cells were serum-starved for 48 hours followed by stimulation with 100 nM Ang II for 24 hours. Protein synthesis was measured by [ $^3$ H]-Leucine incorporation. Data are combined from two independent experiments and are displayed as mean  $\pm$  SD. \*\*, significantly below the corresponding NT condition  $P < 0.01$ . **C)** Human aortic VSMC were infected for 48 hours with lentiviral vectors encoding vector alone (pLVX), human TSC1wt (pLVX-TSC1) or human TSC1 in which Ser511 was mutated to Ala (pLVX-TSC1 S511A) followed by serum-starvation for 48 hours. Cells were then treated as described above. Data are combined from two independent experiments and are



displayed as mean  $\pm$  SD. \*, significantly below the corresponding pLVX condition ; two symbols indicate  $P < 0.01$ , and three symbols indicate  $p < 0.001$ . The right panel shows overexpressed TSC1 compare to endogenous (vector alone) in infected human aortic VSMC using immunoblot analysis with an antibody against TSC1.

**Figure 5. Inhibition of IKK $\beta$  abrogates Ang II-induced protein synthesis *in vivo*.** Two groups of rats were infused with Ang II for 26 h, whereas two groups did not receive Ang II. **A)** After 22 h, the animals that were infused with Ang II received the vehicle (n=9) or ML120B (n=7) as an iv bolus dose of 0.25 mg/kg (equivalent to 10  $\mu$ M plasma concentration). In addition, after 22 h, the animals that were not infused with Ang II also received the vehicle (n=6) or ML120B (n=4). The rate of protein synthesis was measured by [ $^3$ H]-Leucine incorporation into the aorta. Data are displayed as mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.005$  vs. Ang II. **B)** After 22 h, the animals that were infused with Ang II received the vehicle (n=13) or ML120B (n=5) as an iv bolus dose of 0.25 mg/kg. In addition, after 22 h, the animals that were not infused with Ang II also received the vehicle (n=12) or ML120B (n=4). The rate of protein synthesis was measured by [ $^3$ H]-Leucine incorporation into the mesenteric arteries. Data are displayed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. Ang II. **C)** Where indicated, rats were infused with Ang II for 6 h. After 2 h of stimulation, vehicle (n=3) or ML120B (n=3) was administrated as described in panel A. Control rats were sham operated. Protein lysates were prepared from aorta and subjected to immunoblot analysis. **D)** Densitometric analysis of VCAM-1 expression relative to  $\beta$ -actin expression presented in panel C.

**Figure 6. Proposed model demonstrating the involvement of IKK $\beta$  in the hypertrophic effect of Ang II.** Following binding to the AT1R, a TRAF6-TAK1 complex leads to T-loop phosphorylation and activation of IKK $\beta$ , which is also under the control of a MEK1/2-ERK1/2 pathway <sup>5</sup>. Activated IKK $\beta$  then phosphorylates p65 to induce an inflammatory response (not shown). Additionally, our study

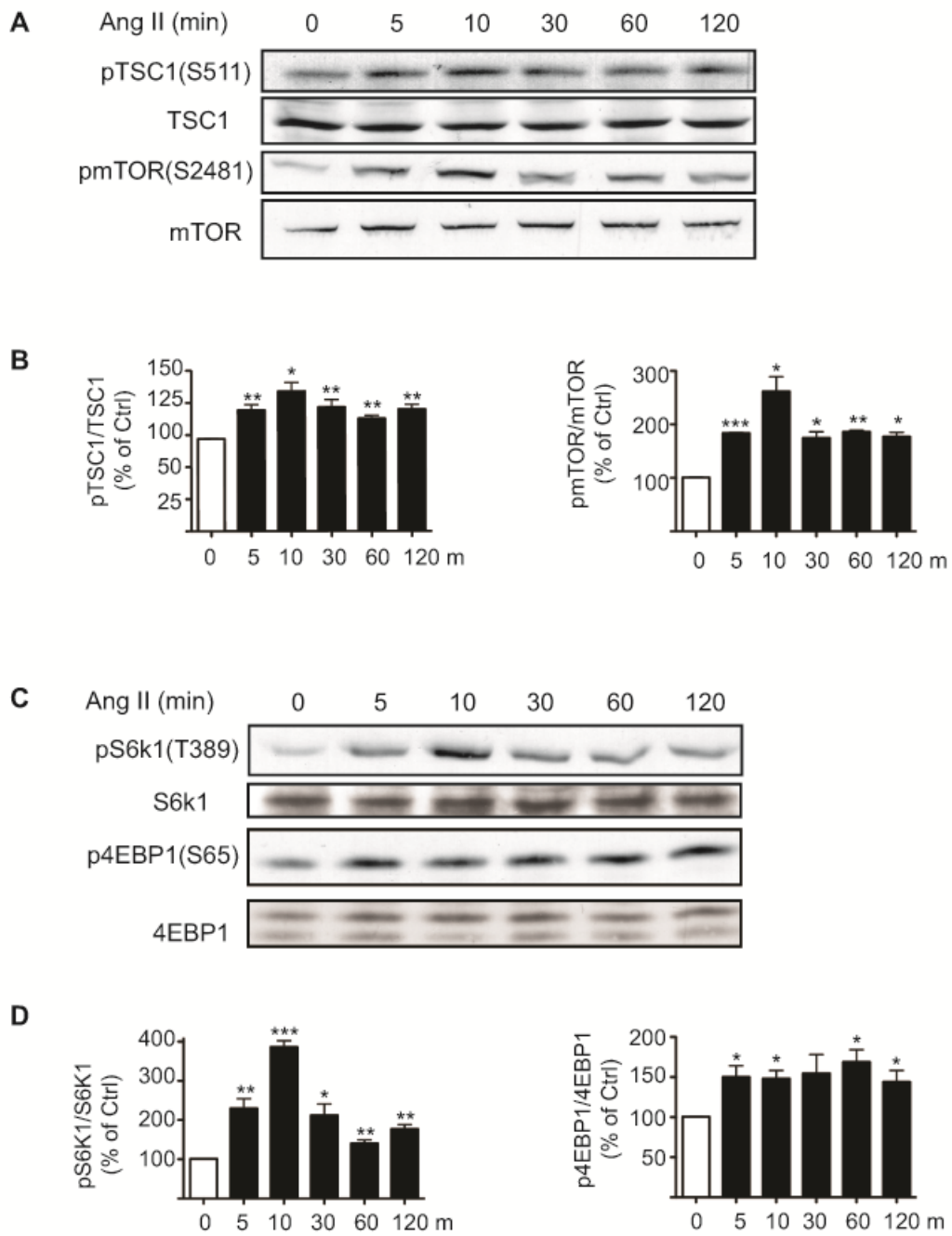
reveals a novel signal transduction pathway whereby activated IKK $\beta$  phosphorylates and inhibits TSC1 to induce mTOR activation, which leads to an increase in the rate of protein synthesis. Through their effect on TSC2, the MEK1/2-ERK1/2-p90RSK and PI3K-PDK1-AKT-p38 signaling modules are also involved in controlling the overall rate of protein synthesis. The protein kinase MNK1, which is activated by ERK1/2, is also implicated in cap-dependent translation.

## Tables

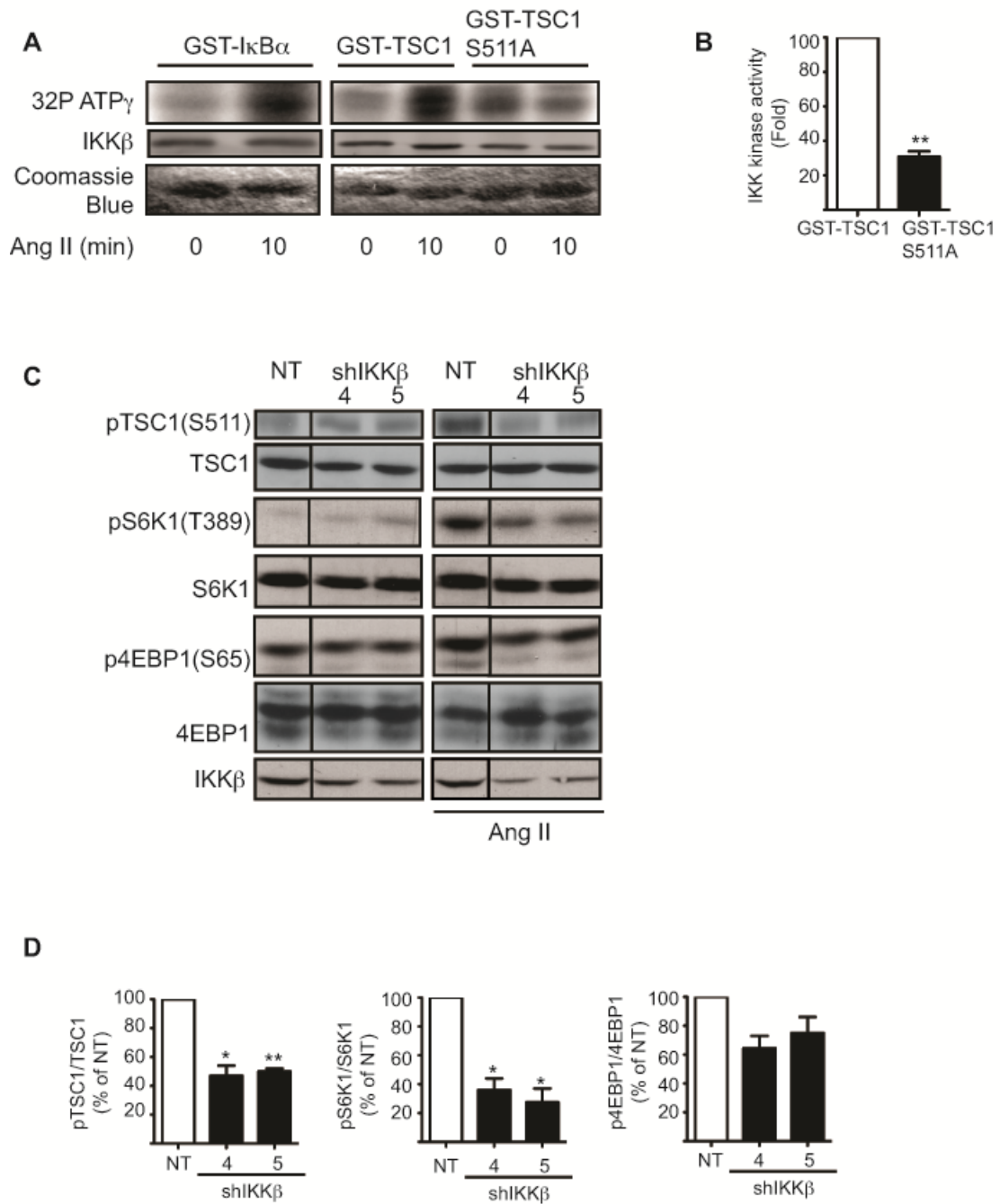
**Table 1. Hemodynamic parameters measured in freely moving rats**

	n	DBP (mmHg)	SBP (mmHg)	MBP (mmHg)
Control	8	110 ± 4	142 ± 4	117 ± 4
Ang II + Vehicle	8	115 ± 6	144 ± 4	128 ± 5
Ang II + ML120B	7	104 ± 6	135 ± 6	114 ± 6

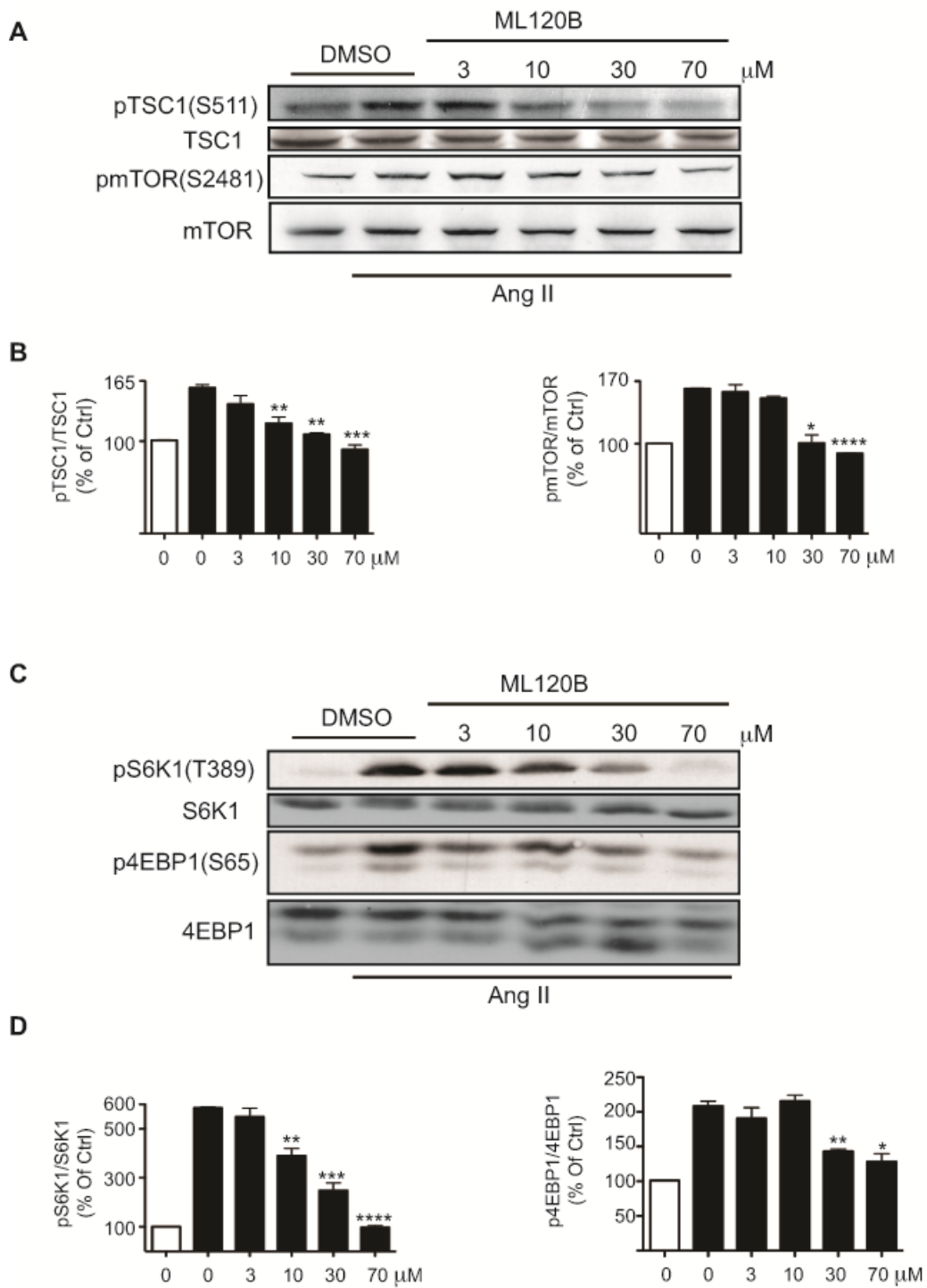
Values are mean ± SEM. n, number of rats per group in which hemodynamic measurements were made. DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; MBP, mean blood pressure.



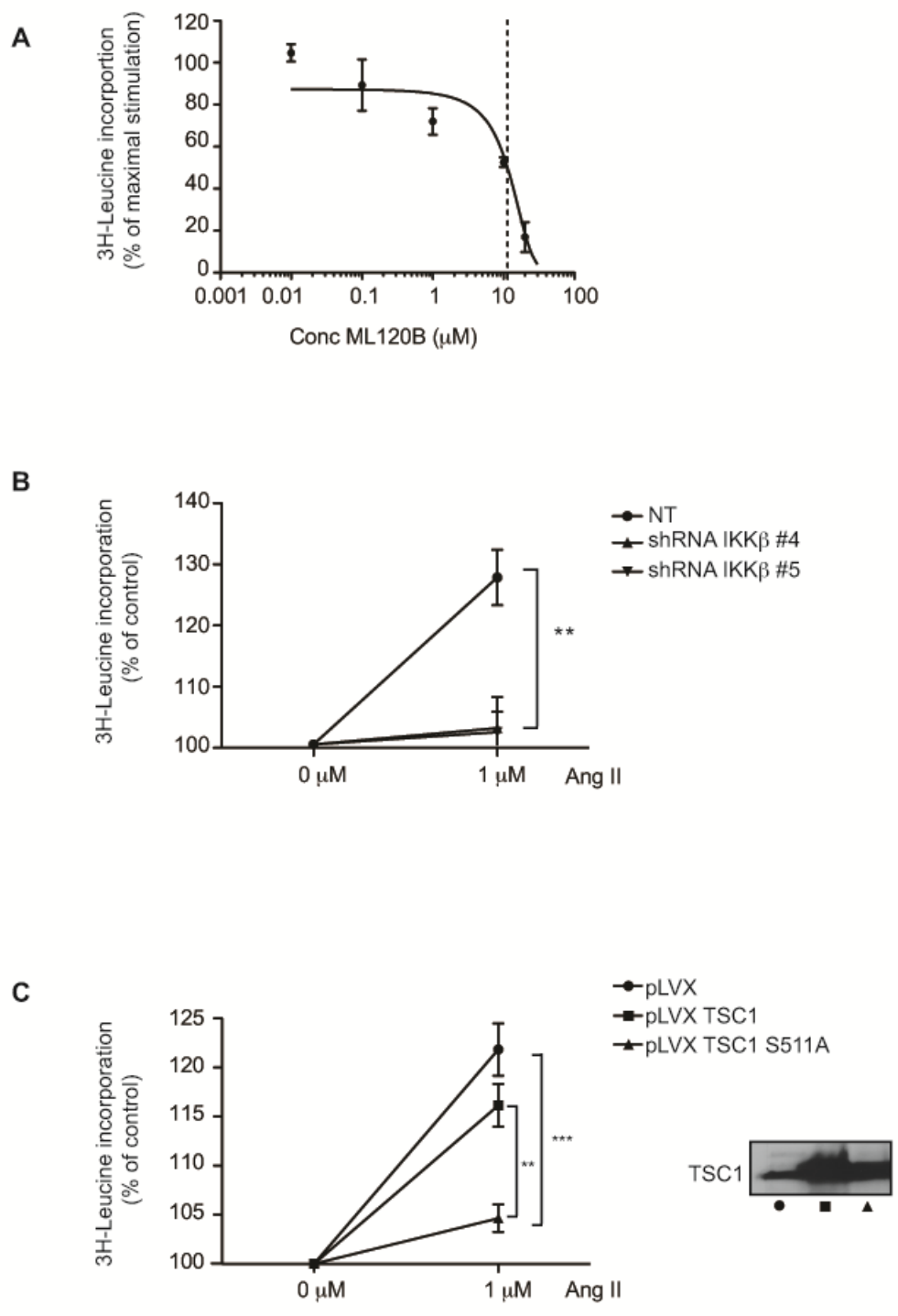
**Figure 1**



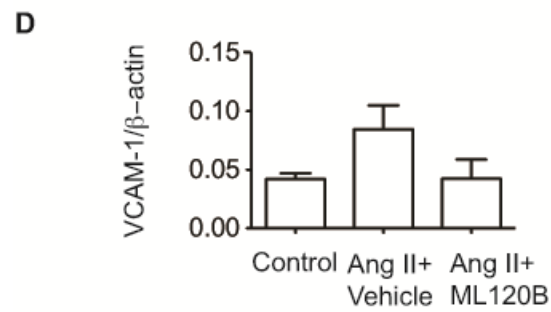
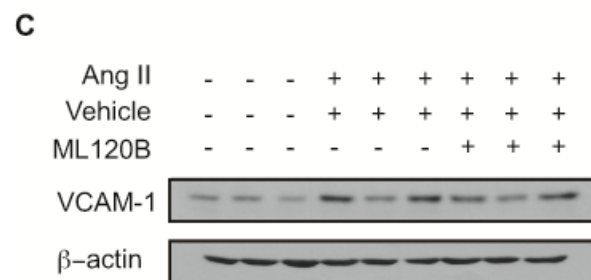
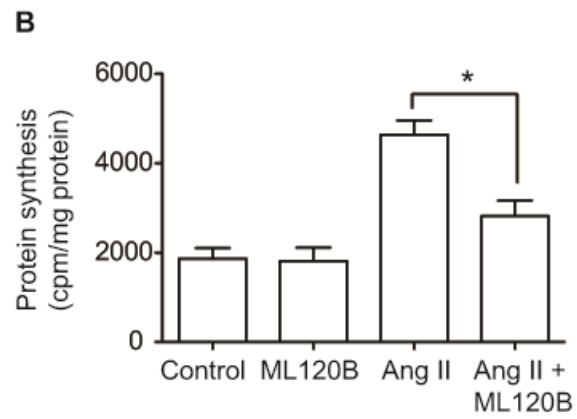
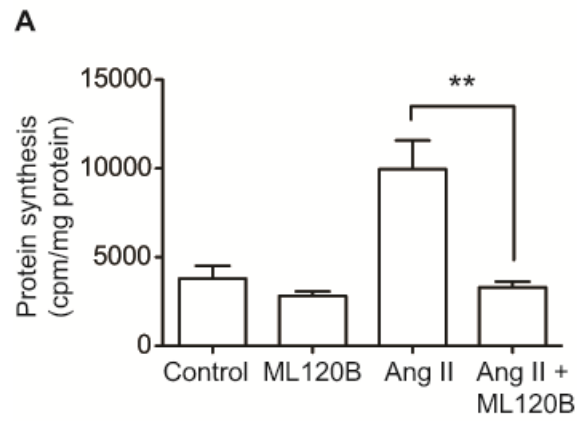
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



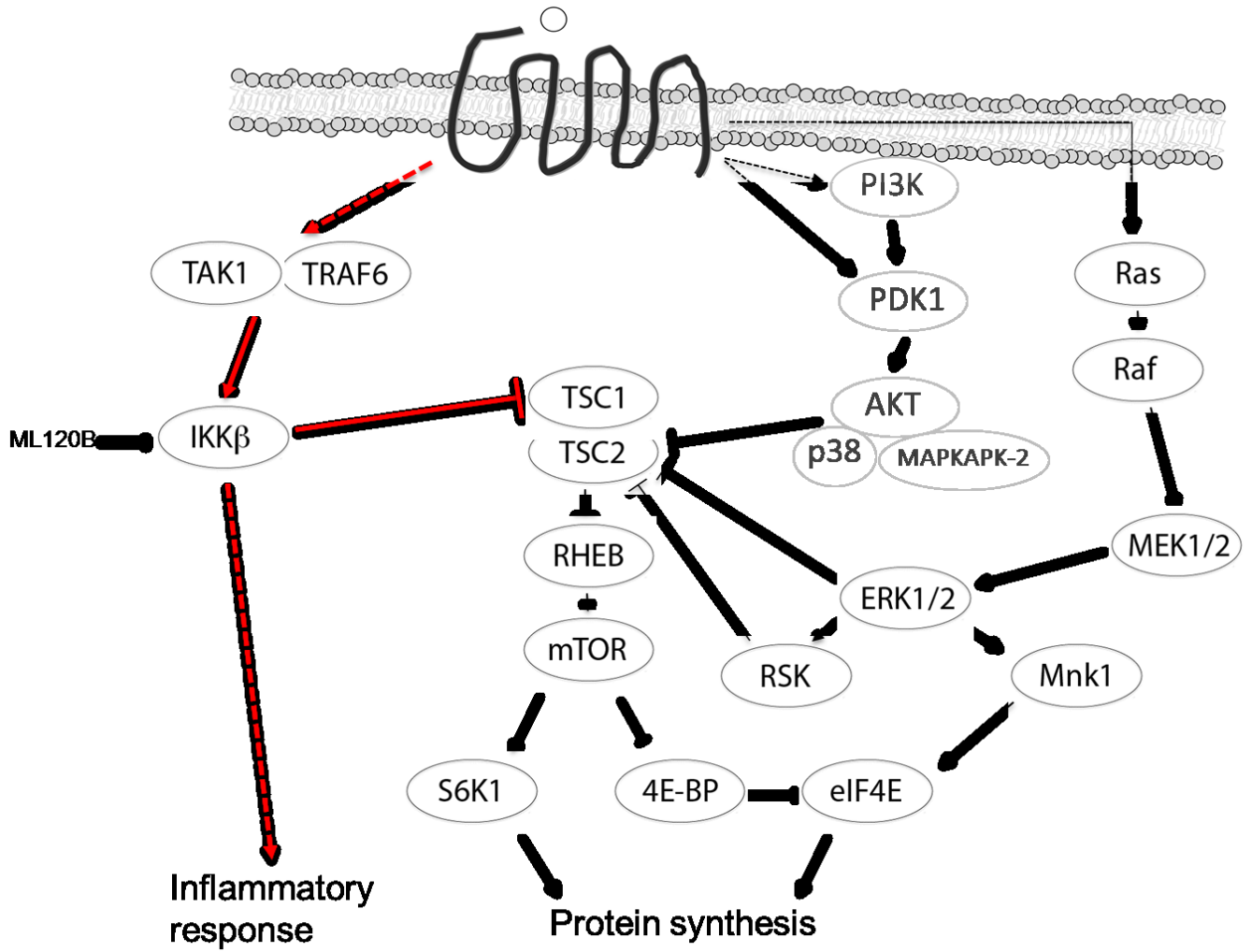
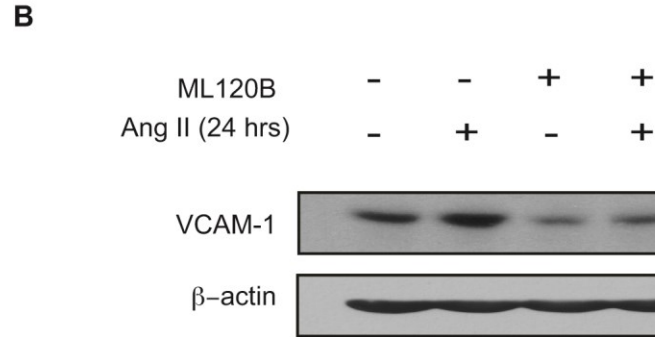
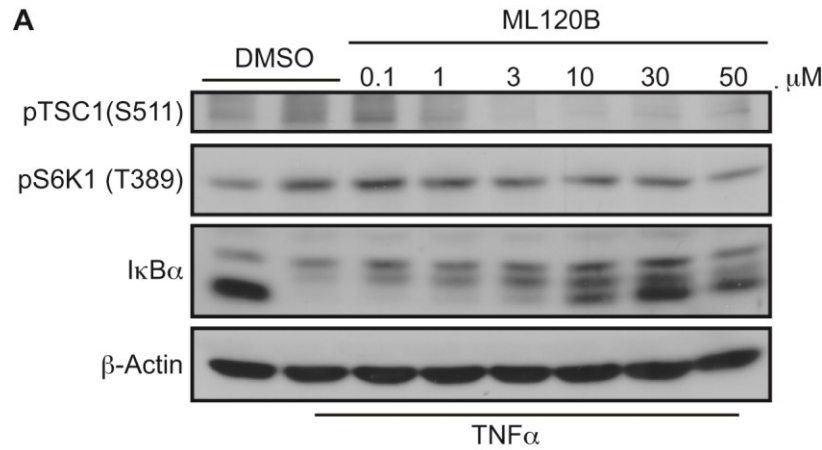
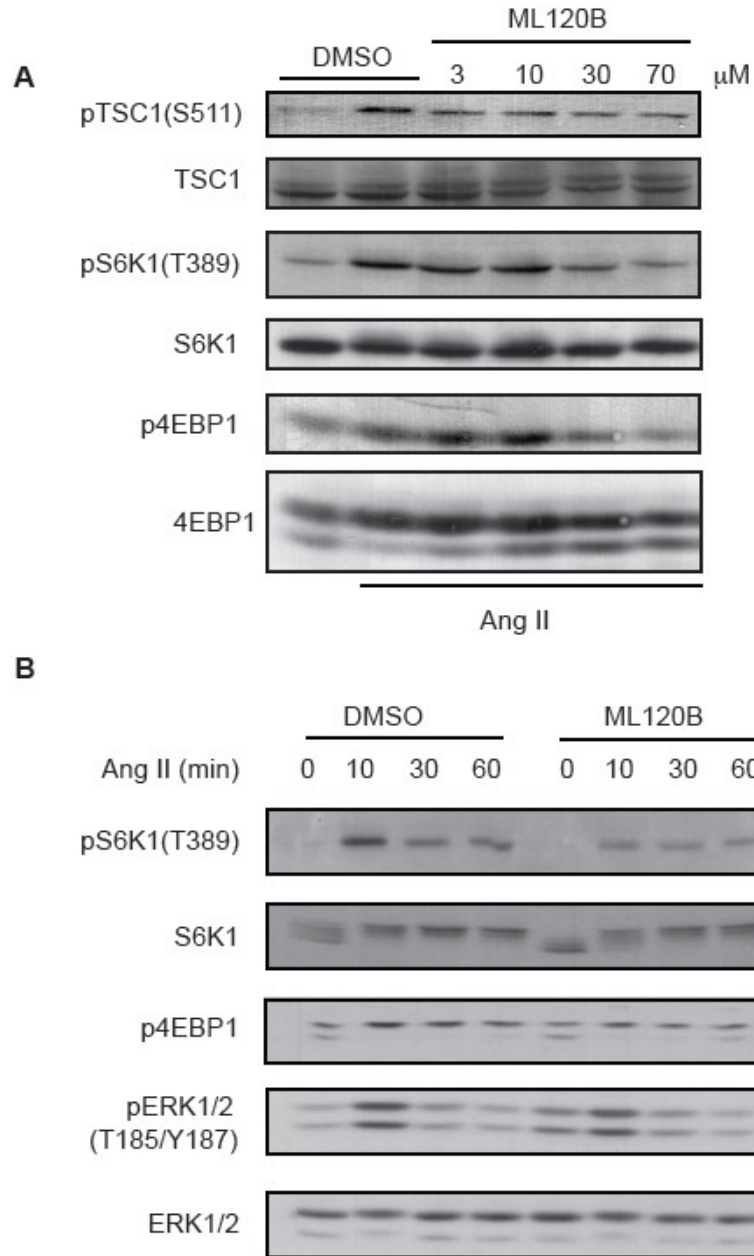


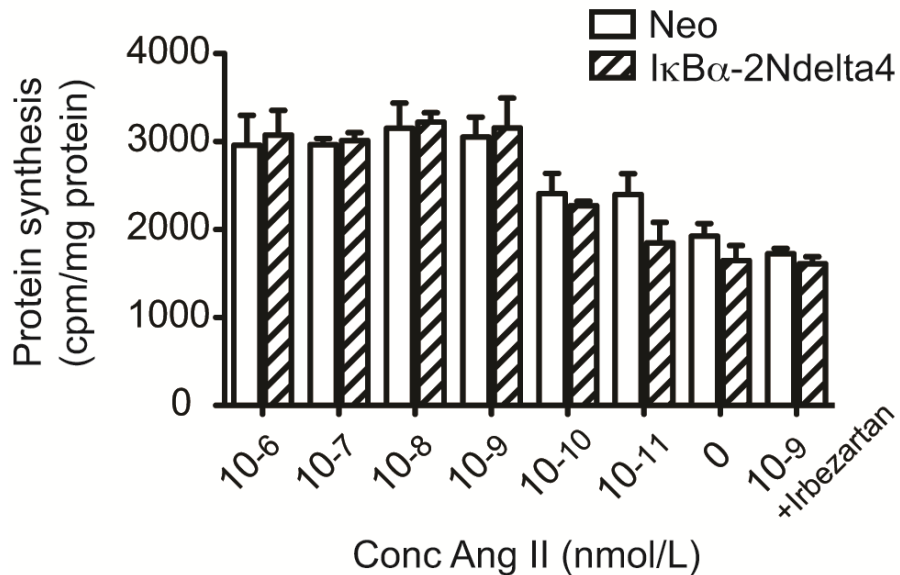
Figure 6



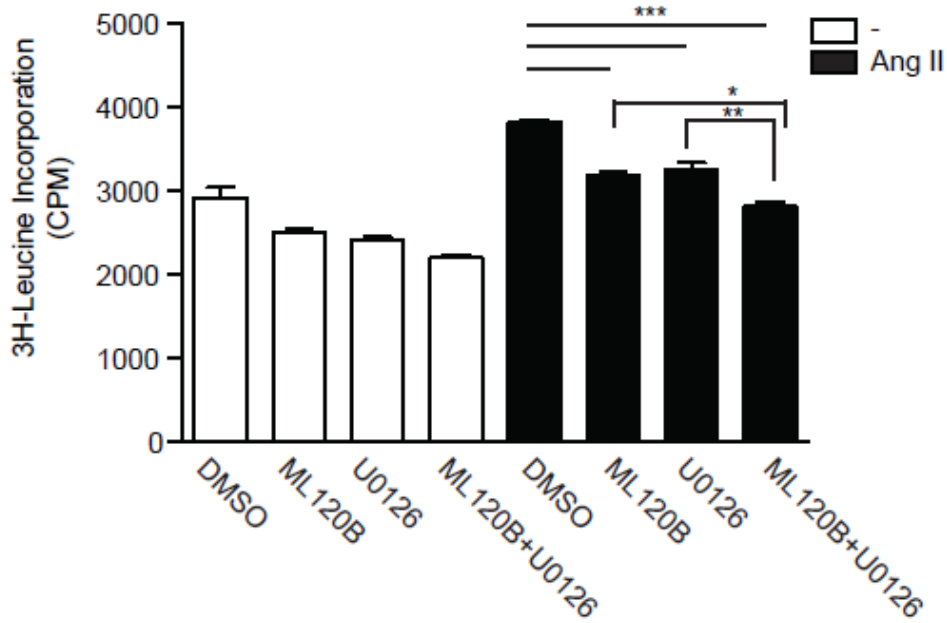
**Supplemental Figure I. ML120B inhibits the proinflammatory actions of TNF- and Ang II in cultured VSMC.** A) Quiescent human aortic VSMC were pretreated with increasing concentrations of ML120B as indicated or the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) 30 minutes before stimulation with 10 ng/ml TNF- for 10 minutes. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis. Data are representative of 2 independent experiments. B) Quiescent rat VSMC were pretreated with vehicle (DMSO) or 30 μM ML120B for 30 minutes before stimulation with 100 nM Ang II for 24 hours in the continuous presence of the drug or vehicle. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis. Data are representative of 2 independent experiments.



**Supplemental Figure II. ML120B inhibits the Ang II-induced activation of effectors of the mTORC1 pathway in rat VSMC.** A) Quiescent rat VSMC were pretreated for 30 minutes with vehicle (DMSO) or increasing concentrations of ML120B. The cells were then stimulated with Ang II (100 nM) for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis. One of three independent experiments with similar results is shown. B) Quiescent rat VSMC were pretreated for 30 min with vehicle (DMSO) alone or 30 μM ML120B, followed by stimulation with 100 nM Ang II over the indicated time-course. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis. One of three independent experiments with similar results is shown.



**Supplemental Figure III. The classical IκBα/NF-κB transcription factors signaling cascade is not involved in the hypertrophic effect of Ang II.** Quiescent rat VSMC populations stably expressing the NF-κB super repressor (I B 2Ndelta4) or encoding for the neomycin cassette only (Neo), were stimulated with Ang II for 24 h. Protein synthesis was measured by [3H]-Leucine incorporation. Each value represents the mean ± SD of triplicate determinations



**Supplemental Figure IV. Additive effect of ML120B and UO126 on Ang II stimulated protein synthesis in VSMC.** Quiescent rat VSMC were pretreated with vehicle or 30  $\mu\text{mol/L}$  ML120B and/or 10  $\mu\text{mol/L}$  UO126 for 30 min. The cells were then stimulated for 24 h with 100 nmol/L Ang II in the continuous presence of vehicle or inhibitor drugs. Protein synthesis was measured by [3H]-Leucine incorporation and each value represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations.

## Chapitre 4 : Discussions et Perspectives

### 1.0 The Journal of Biological Chemistry

La réponse inflammatoire aiguë est un processus physiologique de défense de l'hôte envers une agression telle qu'une infection ou un dommage tissulaire. Elle est bénéfique pour l'organisme et sa fonction est de protéger les tissus contre l'agent néfaste. Une fois l'agent éliminé, l'inflammation cesse afin que l'organisme retrouve son intégrité physiologique. Par contre, dans le cas où elle se trouve dérégulée, la réponse inflammatoire aiguë devient chronique et défavorable pour l'hôte. Elle peut en effet avoir des conséquences potentiellement mortelles, tel le choc septique. Les processus moléculaires et cellulaires à l'origine de la dérégulation de la réponse inflammatoire aiguë ont été démystifiés, des thérapies sont donc disponibles afin d'éviter ou de contrôler l'inflammation chronique qui peut en découler. [285] Un second type d'inflammation, l'inflammation chronique localisée, est caractérisé par la présence d'un foyer d'inflammation à un endroit précis de l'organisme. Elle est engendrée entre autres par des maladies auto-immunes. Les événements à l'origine de ce type d'inflammation sont de mieux en mieux définis. Ainsi, les résultats d'intenses recherches ont permis le développement de traitements ciblant précisément des molécules associées au développement et à la propagation de la maladie. [286] À titre d'exemple, des anti-TNF $\alpha$  sont prescrits à des patients souffrant de la maladie auto-immune polyarthrite rhumatoïde. [287] Un troisième type d'inflammation, soit l'inflammation systémique chronique est un état d'inflammation de bas grade, diffus dans l'organisme, évoluant à bas bruit, sans qu'il y ait de foyer inflammatoire manifeste. Celle-ci est à l'origine de maladies délétères tels que le diabète de type II, l'Alzheimer ainsi que l'athérosclérose. [286] À ce jour, les thérapies visant les pathologies associées à ce type d'inflammation dénotent une efficacité modérée. En effet, ces maladies sont d'origine multifactorielle et les traitements ne

ciblent pas tous les déterminants épidémiologiques puisque leurs médiateurs communs ainsi que les molécules les interprétant sont généralement inconnus. [286]

Les découvertes entourant le SRAA intravasculaire résultent de l'identification d'un tel système au niveau du rein en 1982. [86] Des fonctions inflammatoires et de croissances furent associées au SRAA local de la vasculature suivant l'observation que les inhibiteurs d'ACE et/ou les ARB, à une concentration n'affectant pas la pression artérielle, avaient des effets bénéfiques chez des patients souffrant d'hypertension, de diabète de type 2 et d'athérosclérose. [109] Il fut donc démontré que les effets néfastes du SRAA indépendants de la pression découlent généralement de la liaison de l'Ang II à son RCPG de type AT1. Ainsi, l'axe Ang II/AT1 est maintenant reconnu en tant que facteur de risque pour plusieurs pathologies associées à une inflammation chronique systémique. L'une d'elles, l'athérosclérose, est la première cause de mortalité naturelle en Amérique. Elle atteint les artères de gros et de moyen calibres et cause au final la formation d'une plaque d'athérome composée de lipides, de macrophages, de cellules immunitaires, de CMLV, de collagène et de calcium. [130,288] Les complications associées à la formation de cette plaque sont la diminution de la souplesse et de l'élasticité des artères ainsi que la diminution du rayon de leur lumière. L'événement final consiste en la rupture de l'endothélium l'enveloppant. La brèche ainsi formée est rapidement colmatée par un phénomène d'agrégation plaquettaire qui résulte en la formation d'un caillot sanguin. Celui-ci peut totalement obstruer le vaisseau où il se situe ou obstruer d'autres vaisseaux en son aval s'il se dissocie de l'athérome fissuré. L'athérosclérose est donc associée à diverses pathologies cardiovasculaires, dont l'hypertension, les AVC et les infarctus du myocarde. L'Ang II participe à tous les événements contribuant au développement de la plaque d'athérome et contribue également à sa rupture. [288]

Les traitements préconisés lorsque l'athérosclérose atteint les stades intermédiaires et critiques sont notamment l'intervention coronarienne percutanée, l'endartériectomie de la carotide et le pontage coronarien. En revanche, en ce qui concerne les stades précoces, les thérapies présentement disponibles visent les facteurs de risque de la pathologie parmi lesquels l'obésité, le tabagisme, la

cholestérolémie, le stress, la sédentarité, le diabète, une concentration plasmatique élevée de lipides et le SRAA. La coexistence de plusieurs déterminants pathologiques est fréquente chez un même individu. Une notion importante est que l'augmentation du risque n'est pas additive, mais synergique. [289] Ainsi, plus un individu présente de facteurs de risques, moindre est l'efficacité des thérapies. Ceci s'applique également à d'autres pathologies cardiovasculaires, dont l'hypertension essentielle. Il est donc important d'identifier les médiateurs cellulaires communs aux facteurs de risque afin d'identifier des cibles thérapeutiques influençant directement les pathologies indépendamment d'un facteur de risque donné.

Il a été déterminé que l'un de ces effecteurs est le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B. Celui-ci n'est cependant pas une cible à préconiser puisque le développement de molécules inhibant l'activité transcriptionnelle d'une protéine est de loin beaucoup plus ardu que le développement de composés chimiques régulant l'activité catalytique d'une enzyme. [290] Cependant, il a été déterminé suite à plusieurs études moléculaires concernant l'hypertension et l'athérosclérose que l'obésité, le diabète, l'hyperlipidémie et plusieurs autres facteurs de risque, dont ceux faisant intervenir les protéines pro-inflammatoires/pro-athérogéniques TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPA et Ang II, convergent à l'activation de la sous-unité catalytique IKK $\beta$  du complexe IKK afin d'induire l'activation de NF- $\kappa$ B. [193,291,292] La protéine IKK $\beta$  possède une activité enzymatique de type phosphotransférase, elle est donc une cible thérapeutique potentielle pour contrer l'athérosclérose. Par contre, si elle s'avère être une cible non valide, il importe que d'autres candidats communs aux facteurs de risque aient été identifiés afin d'assurer une continuité efficace des recherches au niveau du développement du médicament. Ainsi, la détermination des protéines impliquées dans l'activation d'IKK $\beta$  est essentielle. Les mécanismes d'activation de cette sous-unité font intervenir deux types d'activité enzymatique modulables par des composés chimiques, soit une activité enzymatique de type phosphotransférase et une activité enzymatique de type E3 ligase. [198] Les voies de signalisation impliquées dans l'activation du complexe IKK par le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPA ont considérablement été caractérisées. Les effecteurs impliqués dans l'activation de ce dernier par l'Ang II, avaient toutefois à être déterminés. C'est en adressant cette



problématique que j'ai publié en collaboration avec mon directeur de recherche Dr. Marc Servant l'article intitulé *Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal S6 kinase intracellular pathways link the angiotensin II AT1 receptor to the phosphorylation and activation of the I $\kappa$ B kinase complex in vascular smooth muscle cells.*

Ce dernier englobe une étude novatrice puisqu'antérieurement à sa parution, seule une autre équipe adressa le mécanisme d'activation du complexe IKK en réponse à l'Ang II. [180] L'équipe du Dr. Peter C. Lucas fut en effet la première à proposer un effecteur couplant l'axe AngII/AT1 au complexe IKK, soit le complexe CBM. Les résultats démontrent que le complexe CBM est impliqué dans l'ubiquitination d'IKK $\gamma$  et que cette modification post-traductionnelle influence positivement la capacité du complexe IKK à activer NF- $\kappa$ B. [293] Par contre, les mécanismes à l'origine de la phosphorylation du complexe IKK en réponse à l'Ang II n'y sont pas adressés. [193] Notre article contribue donc à une compréhension plus approfondie des mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II puisqu'un modèle incluant tant les mécanismes de phosphorylation que d'ubiquitination y est proposé. (JBC Figure. 7) Selon nous, il s'agit à ce jour de l'étude la plus complète sur les voies d'activation du complexe IKK au sein de CMLV exposées à l'Ang II et nous sommes confiants vis-à-vis nos conclusions puisque les résultats que nous y présentons sont soutenus par différentes approches dont chacune est comparée à des contrôles positifs.

Deux conclusions opposées sont citées dans la littérature : l'une qui stipule que l'activation *in vitro* de NF- $\kappa$ B en réponse à l'Ang II dans les CMLV en cultures dépend de l'activation de la sous-unité IKK $\beta$  et une autre qui avance que cette activation est plutôt dépendante de l'activation d'IKK $\alpha$  par la kinase NIK. [193,294] Or, il a été démontré à la suite d'études génétiques *in vivo* que la participation de la sous-unité IKK $\alpha$  au niveau des effets pro-inflammatoires dépendants de l'activation de NF- $\kappa$ B est infime comparativement à l'implication de la sous-unité IKK $\beta$ . [190] La disparité d'une équipe à l'autre concernant les résultats des expériences *in vitro* peut découler du fait que les CMLV en culture ont la capacité d'adopter différents sous-phénotypes synthétiques, parmi lesquels les sous-phénotypes épithélioïdes et

fusiformes. Ces dernières cellules sont visuellement distinctes et diffèrent également au niveau de leurs caractéristiques cellulaires. En effet, à l'inverse des cellules fusiformes, les cellules épithélioïdes peuvent survivre en l'absence de sérum, cessent de croître à confluence et sont plus sensibles à l'apoptose. De plus, elles présentent un taux de prolifération et de migration plus élevés que leurs consœurs. [295] Les cellules fusiformes sont quant à elles plus sensibles à différents composés, dont l'Ang II. [296] Ces deux types de sous-phénotypes ont été isolés au sein de plaques d'athéromes chez l'humain. [297] En ce qui concerne nos résultats, ils vont de pair avec la première conclusion puisque nous démontrons que la sous-unité IKK $\beta$  et non IKK $\alpha$  est impliquée dans les effets pro-inflammatoires induits par l'Ang II dans les CMLV. (JBC Figure. S1)

Également notre étude, illustre deux nouveaux effecteurs couplant la signalisation de l'axe Ang II/AT1 au complexe IKK et ultimement à NF- $\kappa$ B, soit la E3 ligase TRAF6 et la kinase TAK1. Elle est la toute première à démontrer l'activation de la IKK kinase TAK1 par un RCPG. De plus, elle attribue une nouvelle fonction à la voie MEK1/2-ERK-RSK, qui est son implication au niveau de l'activation soutenue d'IKK $\beta$ . Le modèle qui y est proposé stipule que la voie PKC $\alpha$ -CBM-TRAF6-TAK1 est responsable de la phosphorylation/activation rapide d'IKK $\beta$  dépendante des seconds messagers et qu'elle est suivie d'une seconde vague de phosphorylation/activation qui requiert la voie MEK1/2-ERK1/2-RSK. (JBC Figure. 7)

### **1.1 Voie d'activation précoce d'IKK $\beta$ dépendante de l'Ang II**

La phosphorylation directe d'IKK $\beta$  par une PKC conventionnelle n'a jamais été décrite. Ceci étant, l'implication de la PKC $\alpha$  dans la phosphorylation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II dans les CMLV est expérimentalement supportée dans notre étude par différentes approches telles que l'emploi d'un inhibiteur pharmacologique ainsi que d'un chélateur de calcium et la diminution de l'expression de la PKC $\alpha$  par deux différents duplexe d'ARN interférents (siARN). (JBC Figure. 2, 4H) De plus, elle est littérairement appuyée par la fonction essentielle qu'occupent les PKC dans l'activation du complexe IKK en aval des récepteurs des cellules B et des cellules T. En effet, dans ces cellules les PKC phosphorylent la protéine d'échafaudage

CARMA1 afin d'induire le recrutement du complexe CBM au récepteur activé. [282,283] Le complexe CBM est à l'origine de l'oligomérisation de la E3 ligase TRAF6 et donc de son activation. Une fois active, TRAF6 est responsable de l'activation de TAK1 dont la fonction est d'activer IKK $\beta$ . Au niveau de notre étude, l'activation du complexe IKK en réponse à l'Ang II dépend également de la phosphorylation d'IKK $\beta$  par TAK1 dont la propre activation est sous la gouverne de la E3 ligase TRAF6 et d'une PKC, soit la PKC $\alpha$ . Le modèle proposé dans cette étude pour l'axe Ang II-AT1-IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B suggère donc qu'à la suite de la production des seconds messagers, la PKC $\alpha$  est l'effecteur en amont de toute la cascade de signalisation déclenchant ultimement les différents processus inflammatoires. Elle agit probablement au niveau de CARMA3 afin de coupler le récepteur AT1 à TRAF6, TRAF6 à TAK1, TAK1 à IKK $\beta$  et finalement IKK $\beta$  à NF- $\kappa$ B. Or, bien que l'état de phosphorylation de CARMA3 n'ait pas été évalué au cours de cette étude, l'équipe du Dr. Peter C. Lucas démontre que suivant la phosphorylation de CARMA3 par une PKC non identifiée, le complexe CBM est recruté au récepteur AT1 dans les CMLV exposées à l'Ang II afin d'induire l'activation du complexe IKK. [293] Ainsi, puisque le complexe CBM est recruté au récepteur AT1, qu'il est connu pour activer TRAF6 et que dans notre étude, cette E3 ligase ainsi que la PKC $\alpha$  se situent en amont de TAK1 et d'IKK $\beta$ , l'axe Ang II-AT1-PKC $\alpha$ -CBM-TRAF6-TAK1 a été proposé pour l'activation rapide d'IKK $\beta$ , soit en deçà de cinq minutes. Bien que précoce, cette activation du complexe IKK participe à 50% de la réponse inflammatoire dépendante de l'Ang II dans les CMLV, ce qui témoigne son importance physiologique. (JBC Figure. 6A-B) De plus, nous avons observé qu'en réponse à l'Ang II, TAK1 active les protéines AKT, p38 et JNK dans les CMLV. Ces effecteurs sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, la survie et la migration cellulaire, des événements qui, en conjonction avec l'inflammation, contribuent au remodelage vasculaire. Il est donc possible que la voie de signalisation précoce de l'Ang II participe à ce processus. Toutefois, le remodelage vasculaire se développe sur plusieurs années. [298] De quelle manière une voie d'activation aussi précoce peut-elle alors influencer un phénomène évoluant si lentement? Afin d'assurer une régulation efficace du tonus des artères, le SRAA intravasculaire est constitutivement actif. Les cellules de la vasculature, dont les

CMLV sont donc constamment exposées à l'Ang II. La signalisation Ang II-AT1-PKC $\alpha$ -CBM-TRAF6-TAK1, bien que précoce, est donc continue et soutenue ce qui permettrait d'expliquer sa probable participation au remodelage vasculaire dépendant de l'âge. Qui plus est, des facteurs de risques tels l'hypertension, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'obésité abdominale et certaines cytokines augmentent l'activité du SRAA intravasculaire ce qui accélère le processus de remodelage vasculaire. [131-135] Par conséquent, la signalisation précoce de l'Ang II peut être à la fois soutenue et amplifiée, ce qui conduit probablement à son implication dans la réponse pathologique des CMLV.

La phosphorylation d'IKK $\beta$  induite par la voie Ang II-AT1-PKC $\alpha$ -CBM-TRAF6-TAK1 semble dépendante de l'ubiquitination. En effet, nous démontrons que TAK1 est phosphorylée et donc activée en réponse à l'Ang II. (JBC Figure. 4B-C) Or, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle essentielle à la phosphorylation et donc à l'activation de TAK1. [299] De plus, nous illustrons que la diminution de l'expression de la E3 ligase TRAF6 provoque une réduction de la phosphorylation et donc de l'activation de TAK1. (JBC Figure. 3) Ainsi, puisque nous concluons que la IKK kinase impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B est TAK1 via sa capacité à phosphoryler IKK $\beta$  nous proposons un modèle où l'ubiquitination est prémisses à la phosphorylation de cette sous-unité catalytique, tout comme au sein des modèles élaborés pour les agonistes TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ . [198] (JBC Figure. 4A-E-F) Qui plus est, la diminution de l'expression de la E3 ligase TRAF6 provoque une réduction de la phosphorylation d'IKK $\beta$  ce qui concorde avec l'inhibition de l'activation de TAK1. (JBC Figure. 3) Par contre, Sun W. *et al.*, proposent un modèle où en réponse au LPA, un agoniste d'un RCPG tout comme l'Ang II, la E3 ligase TRAF6 régule l'activation du complexe IKK indépendamment de l'activation d'une IKK kinase. Ainsi, bien que le mécanisme d'ubiquitination soit essentiel à l'activation du complexe IKK, la phosphorylation d'IKK $\beta$  est indépendante de cette modification post-traductionnelle et est plutôt directement sous la gouverne de MEKK3. [209] Cette étude est singulière puisqu'à ce jour aucune autre équipe n'a démontré que lorsque l'activation du complexe IKK fait intervenir le mécanisme d'ubiquitination, celui-ci n'est pas à l'origine de la phosphorylation d'IKK $\beta$ . De plus, en présence de ce même

mécanisme, MEKK3 est dispensable pour la phosphorylation de cette dernière. [212,213,300] D'autre part, au niveau des CMLV employées lors de notre l'étude, le mécanisme d'ubiquitination dépendant de la E3 ligase TRAF6 semble également essentiel à la phosphorylation d'IKK $\beta$  en réponse au LPA. (Figure. 22) Les causes à l'origine de la disparité entre les résultats obtenus par Sun W. *et al.*, et les autres équipes de recherche, dont la notre, sont actuellement inconnues, mais pourraient être associées à l'utilisation de modèles cellulaires différents et/ou à l'utilisation de différentes technologies, telle la diminution de l'expression d'un gène de manière transitoire versus la disruption génique. Or, malgré la divergence entre nos résultats et ceux de Sun W. *et al.*, nous sommes confiants des conclusions que nous avons émises concernant l'axe Ang II/AT1 et le LPA chez les CMLV. De plus, afin de consolider nos observations nous démontrons qu'en réponse à un autre agoniste des RCPG, soit la thrombine, la phosphorylation d'IKK $\beta$  est également dépendante de TRAF6. (Figure. 23)

### **1.1.1 Implications thérapeutiques de la voie précoce : Accent sur l'athérosclérose**

La possibilité d'inhiber les protéines PKC afin de contrôler et/ou de contrer le développement de l'athérosclérose a été abordée par Churchill *et al.*, en 2008. [301] Plus particulièrement, l'isoforme PKC $\alpha$  est impliquée dans plusieurs stades du développement de la plaque. Au cours des stades précoces, elle induit la génération de ROS par les monocytes, les cellules endothéliales et les CMLV. Les ROS sont à l'origine de l'oxydation des LDL et ces LDL modifiés causent de surcroît l'activation de la PKC $\alpha$  dans les cellules endothéliales ce qui y induit l'expression de molécules d'adhésion pour les monocytes circulant. Également, la PKC $\alpha$  est impliquée dans la déstabilisation de la plaque en induisant l'apoptose des CMLV. Malgré ces effets délétères, cette protéine n'est pas une cible à préconiser puisqu'elle prévient le développement de l'athérosclérose en participant à l'absorption hépatique des LDL. En effet, les LDL sont l'un des premiers effecteurs à la source de cette pathologie lorsque retrouvées en concentration élevée dans le plasma, ainsi leur clairance par le foie est essentielle. [301]

La E3 ligase TRAF6 est fortement exprimée dans les plaques athérosclérotiques formées chez des souris n'exprimant pas de récepteurs pour les LDL et soumises à une diète riche en lipide. [302] De là, de nombreuses études se sont questionnées sur la fonction de cette E3 ligase dans le développement de l'athérosclérose. Malencontreusement, les résultats obtenus sont conflictuels. En effet, certaines équipes démontrent que TRAF6 est une protéine pro-athérogénique, d'autres anti-athérogénique et d'autres stipulent que TRAF6 n'est tout simplement pas impliquée dans le développement de la pathologie. [303] Par contre, une étude parue en 2012 a partiellement éclairé la cause de cette disparité entre les diverses équipes. Il y est démontré que chez des souris développant spontanément l'athérosclérose, soit chez un modèle de souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, la fonction de TRAF6 pour l'athérosclérose est cellule-spécifique. Ainsi, *in vivo* au niveau des cellules endothéliales, l'absence de TRAF6 est à l'origine de la diminution de la sévérité de l'athérosclérose. En effet, la délétion de cette E3 ligase cause l'inhibition de l'expression des gènes pro-inflammatoires sous la gouverne de NF-κB. Cette observation va de pair avec les résultats que nous avons obtenus dans les CMLV aortiques de rat en culture dans notre étude. En revanche, l'absence de TRAF6 dans les macrophages augmente la sévérité de la pathologie. En effet, TRAF6 y est anti-athérogénique en y favorisant la production de la protéine anti-inflammatoire IL-10, la survie cellulaire et la capacité d'efferocytose. [304] Ces résultats appellent à la prudence vis-à-vis l'application systémique d'inhibiteurs de TRAF6 pour le traitement de l'athérosclérose. Si cette cible s'avère valide, il s'agira de déterminer des stratégies dans le but de cibler spécifiquement les cellules endothéliales et potentiellement les CMLV. Le terme potentiellement est précédemment employé puisque malgré nos résultats concluants démontrant l'importance de TRAF6 dans les effets pro-inflammatoires induits par l'Ang II dans les CMLV, cela n'a pas été démontré *in vivo*. [180]

Depuis son identification en 1995 en tant qu'effecteur de la signalisation TGFβ-dépendante, la protéine TAK1 est associée à plusieurs activités cellulaires, dont l'apoptose, l'immunité innée et l'inflammation. La potentialité de TAK1 en tant que cible thérapeutique a été déterminée récemment pour plusieurs désordres

inflammatoires. En outre, la délétion du gène codant pour TAK1 chez des souris souffrant de fibrose rénale a fortement diminué la pathologie. [206] Aussi, l'injection intra-cérébroventriculaire d'un inhibiteur de TAK1, le 5Z-7-oxozeaenol, précédant ou suivant la provocation d'une ischémie cérébrale chez des souris réduit significativement la taille de l'infarctus et les dommages cognitifs qui lui sont associés. [305] En plus de la démonstration que TAK1 est à l'origine de nombreux désordres pathologiques, l'excitation des chercheurs vis-à-vis la potentialité de TAK1 en tant que cible thérapeutique provient de la disponibilité de composés chimiques oralement actifs inhibant spécifiquement TAK1. [306] Par contre, puisque TAK1 est impliquée dans l'immunité innée et d'autres fonctions physiologiques essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, l'implication de son inhibition systémique reste à être déterminée. D'autre part, peu d'équipes de recherche ont adressé le rôle direct de TAK1 dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Toutefois, en addition à notre étude qui démontre son implication dans l'activation d'IKK $\beta$  dans des CMLV exposées à l'Ang II, une étude comparative de l'expression génique au niveau de l'endothélium de l'arc aortique, soit la région la plus susceptible au développement de l'athérosclérose, et de l'endothélium de l'aorte thoracique descendante, soit la région la moins susceptible au développement de cette pathologie, démontre que TAK1 est l'un des gènes dont l'expression est le plus régulée à la hausse au sein des cellules endothéliales de l'arc aortique chez des souris. Ceci illustre que TAK1 est possiblement une protéine précurseur au développement des plaques athéromateuses. [307] De plus, elle est un point de convergence au même titre qu'IKK $\beta$  pour plusieurs autres facteurs de risque de l'athérosclérose. Il serait donc intéressant d'entamer des études *in vivo* telles que celles réalisées pour la PKC $\alpha$  et TRAF6 afin de déterminer la potentialité thérapeutique de TAK1 vis-à-vis l'athérosclérose.

## **1.2 Voie d'activation tardive d'IKK $\beta$ dépendante de l'Ang II**

Dans notre étude, l'inhibition de la signalisation précoce via la diminution de l'expression de TRAF6 dans les CMLV par des siARN réduit drastiquement la phosphorylation rapide d'IKK $\beta$  dépendante de l'Ang II, soit en quarante-cinq

secondes. Par contre, cette inhibition de l'expression de TRAF6 n'a qu'un effet partiel sur la phosphorylation tardive d'IKK $\beta$ , soit en dix minutes, ce qui suggère qu'une autre voie intracellulaire indépendante de la voie précoce assure la phosphorylation retardée d'IKK $\beta$ . (JBC Figure. 3) Il a été démontré que les siARN peuvent affecter des cibles non spécifiques. Conséquemment, les conclusions émises à partir d'un seul duplexe de siARN sont scientifiquement précaires. La convention parmi les scientifiques est l'emploi au minimum de deux différents duplexes de siARN ciblant une même protéine ou l'emploi d'un seul duplexe en conjonction à une autre technique tangible. [308] Ainsi, les résultats que nous avons obtenus à partir de la technologie siARN nous paraissent robustes puisqu'ils sont identiques pour les quatre différents duplexes ciblant TRAF6. Dans les CMLV exposées à l'Ang II, la phosphorylation tardive d'IKK $\beta$  est indépendante de la voie PKC $\alpha$ -CBM-TRAF6-TAK1, mais parallèle l'activation de la protéine ERK1/2, soit à partir de cinq minutes. (JBC Figure. 2A-C) Nous avons donc vérifié l'implication de la voie MEK1/2-ERK1/2 au niveau de la phosphorylation tardive d'IKK $\beta$ . Afin de s'assurer de la véracité de nos observations, nous avons utilisé deux inhibiteurs allostériques chimiquement indépendants, mais visant tous deux MEK1/2. La phosphorylation/activation rapide d'IKK $\beta$  n'est pas affectée par ces traitements tandis que la phosphorylation/activation retardée d'IKK $\beta$ , au-delà de cinq minutes, en est significativement diminuée. (JBC Figure. 5A-B) La protéine RSK est l'une des cibles les plus caractérisées de la voie MEK1/2-ERK1/2, son implication dans la phosphorylation d'IKK $\beta$  a donc été évaluée. Une fois de plus, nous avons fait preuve de rigueur scientifique au niveau de nos résultats en illustrant que RSK est bel et bien impliquée dans la phosphorylation d'IKK $\beta$  via l'application de deux techniques, une approche pharmacologique de type inhibitrice et une approche siARN. (JBC Figure. 5G-H) Comparativement aux résultats obtenus avec les inhibiteurs de MEK1/2, une faible diminution de la phosphorylation rapide d'IKK $\beta$  est observée suivant le traitement des CMLV avec le composé chimique ciblant RSK, le BI-D1870. Ceci peut potentiellement s'expliquer par le fait que le BI-D1870 inhibe partiellement la PKC $\alpha$  *in vitro*. [309] Qui plus est, l'approche siARN confirme que seule la phosphorylation tardive est affectée par la voie MEK1/2-ERK1/2-RSK. Cette phase tardive d'activation du complexe IKK est



impliquée dans la réponse inflammatoire typique des CMLV dépendante de l'Ang II puisqu'elle diminue de 50% suivant l'inhibition de MEK1/2. (JBC Figure. 6C-E)

La protéine RSK a déjà été proposée en tant qu'effecteur couplant le récepteur AT1 à NF- $\kappa$ B dans les CMLV. En effet, l'étude de Zhang *et al.*, illustre que l'Ang II induit l'activation du complexe IKK ainsi que l'activation de la protéine RSK selon deux voies de signalisation distinctes quoique toutes deux essentielles pour une activation maximale de NF- $\kappa$ B via leur capacité à phosphoryler la sous-unité p65. [310] Or, il y est stipulé que l'inhibition de RSK n'a aucune incidence sur l'état de phosphorylation d'IKK $\beta$ , ce qui va à l'encontre de notre étude. Les conclusions de Zhang *et al.*, découlent d'une seule expérience, soit un immunobuvardage illustrant l'état de phosphorylation d'IKK $\beta$  en présence ou en absence d'un inhibiteur non spécifique de RSK, soit un inhibiteur de MEK1/2, pour un seul temps d'exposition des CMLV à l'Ang II tandis que nous questionnons la fonction de la protéine RSK en étudiant l'état de phosphorylation d'IKK $\beta$  via une approche pharmacologique ciblant directement RSK en conjonction à une approche siARN, et ce, pour un intervalle de temps d'exposition des CMLV à l'Ang II. De plus, contrairement à Zhang *et al.*, nous démontrons que la voie MEK1/2-ERK1/2-RSK est non seulement essentielle à la phosphorylation tardive d'IKK $\beta$  induite par l'Ang II, mais également importante pour l'activation du complexe IKK et pour la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN. (JBC Figure. 5C-F) Nos conclusions se basent donc sur une étude plus exhaustive que l'étude de Zhang *et al.* D'autre part, un article paru en 2004 appuie nos observations. Il y est démontré qu'en réponse aux dommages à l'ADN, RSK a la capacité d'augmenter l'activité phosphotransférase du complexe IKK. [311] En effet, les résultats dénotent que les dommages à l'ADN stimulent l'association entre RSK et IKK $\beta$ . Cette association est à l'origine de l'induction de l'activité phosphotransférase du complexe IKK. Par contre, bien que l'activité catalytique de RSK soit essentielle pour son association à IKK $\beta$ , elle n'a pas la capacité de phosphoryler directement cette dernière. Les mécanismes à l'origine de l'activation du complexe IKK par RSK sont encore à ce jour énigmatiques. Or, la trans-autophosphorylation d'IKK $\beta$  a été suggérée en tant que mécanisme potentiel pour l'activation du complexe IKK. Une étude parue en 2013 démontre que les dimères de sous-unités IKK $\beta$  transitent entre une conformation

ouverte et fermée. Parmi le pool de complexes IKK présents dans le cytoplasme, un certain nombre est constitué de deux dimères de sous-unités IKK $\beta$  et d'un tétramère de IKK $\gamma$ . Au niveau de ces derniers complexes, lorsqu'ils sont en conformation ouverte les deux dimères des sous-unités IKK $\beta$  peuvent se trans-autophosphoryler. Par contre, le changement de conformation entre les positions ouvertes et fermées est si rapide que la trans-autophosphorylation ne peut être achevée. Une protéine s'associant au complexe IKK pourrait stabiliser la conformation ouverte des deux dimères et ainsi permettre une trans-autophosphorylation efficace des sous-unités IKK $\beta$  et donc l'activation du complexe IKK. [312] Il serait intéressant de vérifier si RSK exerce cette fonction lors de l'activation du complexe IKK dans les CMLV en réponse à l'Ang II.

### **1.2.1 Implications thérapeutique de la voie tardive : Accent sur l'athérosclérose**

La voie MEK1/2-ERK1/2 est l'une des cascades de signalisation les plus fréquemment dérégulée dans les cancers puisqu'elle est majoritairement impliquée dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Ainsi, de nombreuses équipes de recherches adressent le développement de molécules inhibant cette voie, plus particulièrement au niveau de MEK1/2 puisque celle-ci ne semble avoir qu'un seul substrat, soit ERK1/2. [313] À ce jour, treize MEK1/2 inhibiteurs ont atteint les essais clinique et le composé trametinib est sous évaluation par la FDA. [314] En plus de sa fonction délétère vis-à-vis le cancer, la voie MEK1/2-ERK1/2 est impliquée dans de nombreuses autres maladies, dont les maladies cardiovasculaires. [315,316] Entre autres, l'expression et l'activation d'ERK1/2 sont augmentées dans les lésions athérosclérotiques chez des lapins recevant une diète riche en cholestérol. [317] Aussi, il a été démontré que la voie MEK1/2-ERK1/2-RSK est impliquée dans la réponse hypertrophique des CMLV en réponse à l'Ang II. [318] De plus, notre étude établit que cette même voie est également impliquée dans la réponse inflammatoire des CMLV en réponse à l'Ang II. D'autre part, une étude parue en 2013 confirme dans un modèle *in vivo* que la protéine RSK est effectivement impliquée dans le développement de l'athérosclérose via ses propriétés pro-inflammatoires. En effet, les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> suivant une diète normale et recevant une concentration faible

d'Ang II développent des lésions athérosclérotiques. Toutefois, la progression des lésions est diminuée suivant l'administration d'un inhibiteur spécifique et irréversible de RSK à ces souris. Cette inhibition du développement de l'athérosclérose corrèle avec une diminution de l'expression des protéines inflammatoires VCAM-1 et E-selectine au niveau des cellules endothéliales. [319] La voie MEK1/2-ERK1/2-RSK est donc une cible attrayante pour le traitement de l'athérosclérose puisque des inhibiteurs de cette dernière ont déjà atteint les essais cliniques et que les évènements hypertrophiques et inflammatoires à l'origine du remodelage vasculaire caractéristique de la pathologie seraient inhibés simultanément. Cependant, les processus inflammatoires ne seraient diminués que de 50% puisque la voie d'activation rapide d'IKK $\beta$  ne serait pas affectée par un tel traitement.

### 1.3 Plurithérapie

Ainsi, dans les CMLV primaires de rat, l'Ang II induit l'activation de la sous-unité catalytique du complexe IKK, IKK $\beta$ , via deux voies de signalisation indépendantes, mais complémentaires pour une activation vigoureuse et soutenue du complexe IKK. La voie initiale correspond à l'axe Ang II-AT1-PKC $\alpha$ -CBM-TRAF6-TAK1-IKK et la voie tardive, à l'axe Ang II-AT1-MEK1/2-ERK1/2-RSK-IKK. De plus, l'activation de ces deux voies est essentielle à l'acquisition complète d'un phénotype inflammatoire par les CMLV en réponse à l'Ang II puisque leur inhibition singulière diminue de 50% la réponse inflammatoire et leur inhibition conjointe l'abroge complètement. (JBC Figure. 6) En plus de l'athérosclérose, l'inhibition de ces voies pourraient contribuer à diminuer les dommages aux organes cibles dépendants du remodelage vasculaire, dont le cœur, le rein, l'œil et le cerveau. Des cibles thérapeutiques intracellulaires ciblant le facteur de risque SRAA ont été révélées par notre étude. Par contre, en analysant les voies de signalisation induites par d'autres agonistes tels le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , le point de convergence demeure IKK $\beta$ . Alors, si la protéine IKK $\beta$  s'avère une cible valide *in vivo*, l'inflammation induite par pratiquement tous les facteurs de risque pourrait être inhibée par un composé chimique la visant. Par ailleurs, si cette cible s'avère invalide due à son importance notamment dans la réponse immunitaire, la plurithérapie peut être envisagée afin de contrer quelques

médiateurs redondants des voies de signalisation induites par les déterminants pathologiques. La E3 ligase TRAF6, la kinase TAK1 et la voie MEK1/2-ERK-RSK font partie de ces effecteurs intracellulaires communs à certains facteurs de risque. La plurithérapie est déjà employée dans le domaine médical afin de contrecarrer différents déterminants pathologiques de l'athérosclérose. Une analyse statistique démontre toutefois que l'efficacité maximum atteinte dans la diminution de la progression de cette pathologie lorsque de deux à trois facteurs de risque sont ciblés est en moyenne de 30% à 40%. [320] De plus, plusieurs plurithérapies visant les facteurs de risque de l'athérosclérose sont contraindiqués puisque les traitements ne sont pas spécifiques à l'athérosclérose et causent ainsi un rapport effets bénéfiques versus effets adverses trop faible. [321] Notre étude ainsi que les recherches d'autres équipes concernant les médiateurs cellulaires spécifiquement impliqués dans le développement et la progression de l'athérosclérose sont donc justifiées pour la découverte de traitements efficaces et sécuritaires. En effet, l'efficacité d'une thérapie employée vis-à-vis une pathologie donnée est déterminée par sa capacité à l'inhiber directement. [322]

#### **1.4 Perspectives et résultats préliminaires les appuyant**

L'équipe du Dr. Peter Lucas démontre que le mécanisme d'ubiquitination est essentiel à l'activation du complexe IKK dans les CMLV exposées à l'Ang II. Qui plus est, nous démontrons que la E3 ligase TRAF6 est impliquée dans l'activation de ce complexe au sein de ces mêmes cellules en réponse également à l'Ang II. Or, les processus moléculaires couplant l'activité E3 ligase de TRAF6 à l'activation du complexe IKK en réponse à l'Ang II sont inconnus. L'une des perspectives découlant de notre étude est donc de démystifier ces événements.

Il a été déterminé récemment que TRAF6 a la capacité d'induire la formation de chaînes de poly-Ub en Lys63 couplées de manière covalente à ses substrats et d'induire la formation de chaînes libres de poly-Ub également en Lys63. [174] D'autre part, il a été démontré que l'activation d'IKK $\beta$  par la IKK kinase TAK1 est dépendante de la production de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 par TRAF6 en réponse à l'IL-1 $\beta$ . Concrètement, ces chaînes sont à l'origine de l'autophosphorylation/activation de

TAK1 via leur association à l'UBD de TAB2 et sont responsables de la proximité entre cette kinase et le complexe IKK suivant leur liaison à l'UBD de TAB2 et d'IKK $\gamma$  respectivement. L'hypothèse selon laquelle ces chaînes libres de poly-Ub en Lys63 sont des seconds messagers a été émise dans la littérature, puisqu'elles sont produites au niveau d'un microenvironnement et que leur simple présence dans un essai *in vitro* est suffisante pour l'activation de TAK1. [174] Ainsi, ces dernières vis-à-vis les kinases pourraient être aussi importantes que le DAG et le calcium vis-à-vis les PKC conventionnelles.

Ces dernières informations ont contribué à répondre partiellement à l'une des principales questions résultant de notre étude précédente, soit la démystification des processus moléculaires couplant le mécanisme d'ubiquitination induit par TRAF6 à l'activation d'IKK $\beta$  dans les CMLV exposées à l'Ang II. En effet, en nous basant sur la littérature nous avons effectué de nouvelles expériences qui démontrent que l'Ang II induit la formation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 au niveau du complexe IKK et de TAB2 au sein des CMLV. (Figure. 24, 25) Ces expériences font intervenir un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys63 et une DUB recombinante, soit l'isoT. La particularité de cette DUB est qu'elle ne clive que les chaînes libres de poly-Ub. En premier lieu, le complexe IKK et TAB2 ont été immunoprécipités à partir d'extraits cellulaires de CMLV exposées à l'Ang II. Les extraits immunoprécipités ont par la suite été traités ou non avec l'isoT préalablement à leur analyse par immunobuvardage avec l'anticorps spécifique aux chaînes en Lys63. En l'absence de traitement avec l'isoT, il y a une induction de la formation de chaînes de poly-Ub en Lys63. Or, en sa présence aucun signal de poly-ubiquitination en Lys63 n'est détecté ce qui signifie que les chaînes immunoprécipitées ont été clivées. Il est donc légitime d'affirmer que les chaînes qui s'associent au complexe IKK et à TAB2 en réponse à l'Ang II sont des chaînes libres de poly-Ub en Lys63. Tel que nous l'avons démontré, l'activation de TAK1 et d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II dépend de la présence de TRAF6. Les chaînes libres de poly-Ub en Lys63 sont donc susceptibles d'être produites par cette E3 ligase et d'être à l'origine de l'autophosphorylation/activation de TAK1 ainsi que de sa proximité à IKK $\beta$ . Afin de déterminer si ces chaînes sont effectivement produites par TRAF6, nous traiterons des CMLV avec une stratégie

shARN pour diminuer l'expression de TRAF6 préalablement à l'analyse de la production de chaînes libres de poly-Ub en Lys63.

Les chaînes libres doivent présenter un certain nombre de propriétés pour être considérées comme seconds messagers. En effet, la production de seconds messagers doit être rapide ainsi que transitoire et l'action du premier messenger doit pouvoir être reproduite simplement en augmentant expérimentalement la concentration du second messenger. Nous avons donc développé un essai permettant de trapper les chaînes libres de poly-Ub dans le but de déterminer si leur production est rapide et transitoire en réponse à l'Ang II dans les CMLV. Au niveau de cet essai, les chaînes de poly-Ub sont isolées via leur immunoprécipitation avec la protéine recombinante GST-ZnF, soit une protéine GST conjuguée uniquement à l'UBD de l'isoT et donc à un domaine protéique s'associant seulement à des chaînes libres. Nous avons démontré que cet essai est fonctionnel puisque des chaînes libres de poly-Ub en Lys63 ont été trappées suivant la stimulation des CMLV avec de l'Ang II durant cinq minutes. (Figure. 26) Or, les expériences pour obtenir leur profil de production au cours d'un intervalle de temps donné, soit de une à trente minutes, sont en cours. Afin de déterminer si les chaînes libres répondent à la deuxième propriété définissant les seconds messagers, une stratégie visant l'incorporation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 directement dans les cellules est également en développement. Suite à sa conception, nous emploierons cet essai dans le but d'évaluer la capacité des chaînes libres à activer IKK $\beta$  en absence de stimuli. Ainsi, si les chaînes de poly-Ub en Lys63 répondent aux deux critères caractérisant les seconds messagers et que TRAF6 est à l'origine de leur production, cette E3 ligase pourra être considérée comme un nouvel effecteur, au même titre que l'adénylate cyclase et que la phospholipase C, pour le récepteur AT1.

D'autre part, TRAF6 est potentiellement un nouvel effecteur des RCPG en général, puisqu'à la suite de la stimulation des CMLV avec deux autres agonistes des RCPG, soit le LPA et la thrombine, nous démontrons qu'il y a également synthèse de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 (Figure. 27, 28). De plus, des résultats préliminaires pour la thrombine confirment que la formation des chaînes de poly-Ub en Lys63 est dépendante de TRAF6. (Figure. 29) Ainsi, l'hypothèse selon laquelle

TRAF6 est à l'origine de la formation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 en réponse à l'Ang II, au LPA ainsi qu'au RCPG en général est fortement appuyée.

L'ubiquitination est sujette à une intense régulation négative par les DUBs. L'identification de la DUB à l'origine de la dégradation des chaînes libres en Lys63 produites par TRAF6 en réponse au RCPG représente un aspect notable de la caractérisation des processus moléculaires couplant cette E3 ligase au complexe IKK. Une candidate potentielle est CYLD puisqu'il a été démontré qu'elle est spécifique aux chaînes en Lys63 et qu'elle clive avec une efficacité considérablement supérieure les chaînes libres versus les chaînes covalentes. Cette affirmation est actuellement un sujet d'expérimentation.

En conjonction à ces derniers résultats, nous avons observé que TRAF6 n'est pas seulement à l'origine de l'activation d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II, au LPA et à la thrombine dans les CMLV, mais est également impliquée dans l'activation des protéines AKT, JNK et P38. (Figure. 22, 23, 30) Ces dernières sont des molécules participant notamment à la migration et à l'hypertrophie des CMLV. Or, nous démontrons que la diminution de l'expression de cette E3 ligase affecte effectivement la capacité de l'Ang II à induire ces effets dans les CMLV. (Figure. 31 A, B) La technologie «scratch assay» a été employée pour observer l'état migratoire des CMLV. [323] Afin de quantifier cette observation des essais de migration sont présentement effectués. La E3 ligase TRAF6 semble donc être non seulement un point de convergence pour plusieurs RCPG, mais également un point de convergence pour les réponses pathologiques associées à l'Ang II dans les CMLV. Ceci appuie notre affirmation selon laquelle TRAF6 est une cible thérapeutique potentielle pour les maladies cardiovasculaires associées à une dérégulation du SRAA et potentiellement associées à d'autres déterminants pathologiques, dont l'IL-1 $\beta$  et le LPA.

Les résultats préliminaires résultant de notre étude ouvrent la porte à l'émission d'une nouvelle publication puisqu'ils pavent la voie à un nouveau concept au sein de la signalisation des RCPG. Les observations initiales illustrent en effet que TRAF6 est potentiellement un nouvel effecteur des RCPG et que cette E3 ligase est à l'origine de la formation d'un nouveau type de second messenger, soit des chaînes

libres de poly-Ub en Lys63. Les conclusions que nous avons obtenues de nos premières expériences dénotent également que TRAF6 est en amont de trois processus impliqués dans le remodelage vasculaire, soit l'inflammation, la migration et l'hypertrophie des CMLV. Le positionnement de cette E3 ligase est donc favorable à une perspective thérapeutique.



### 1.4.1 Figures résultats préliminaires

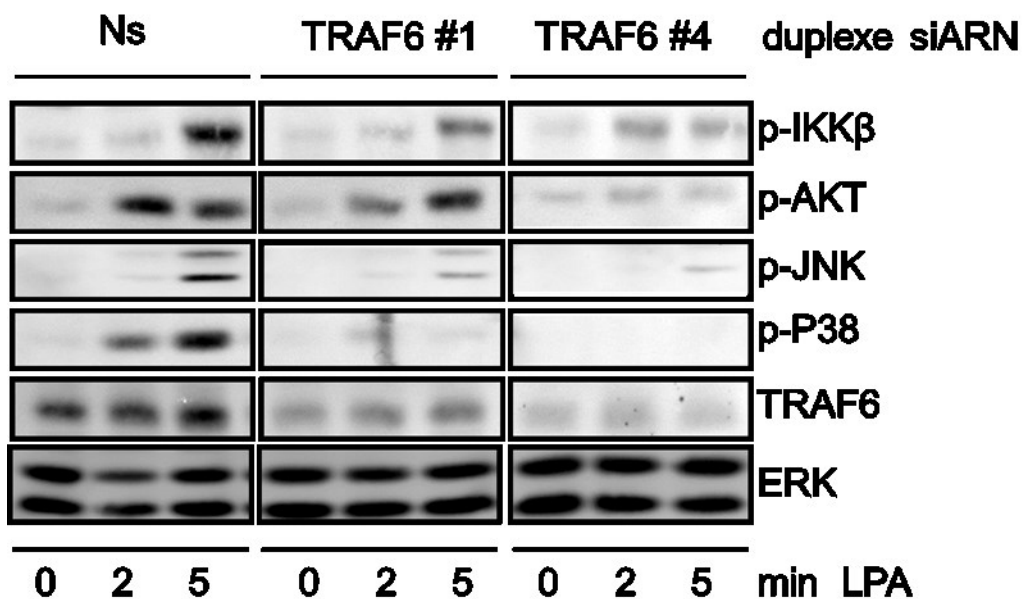
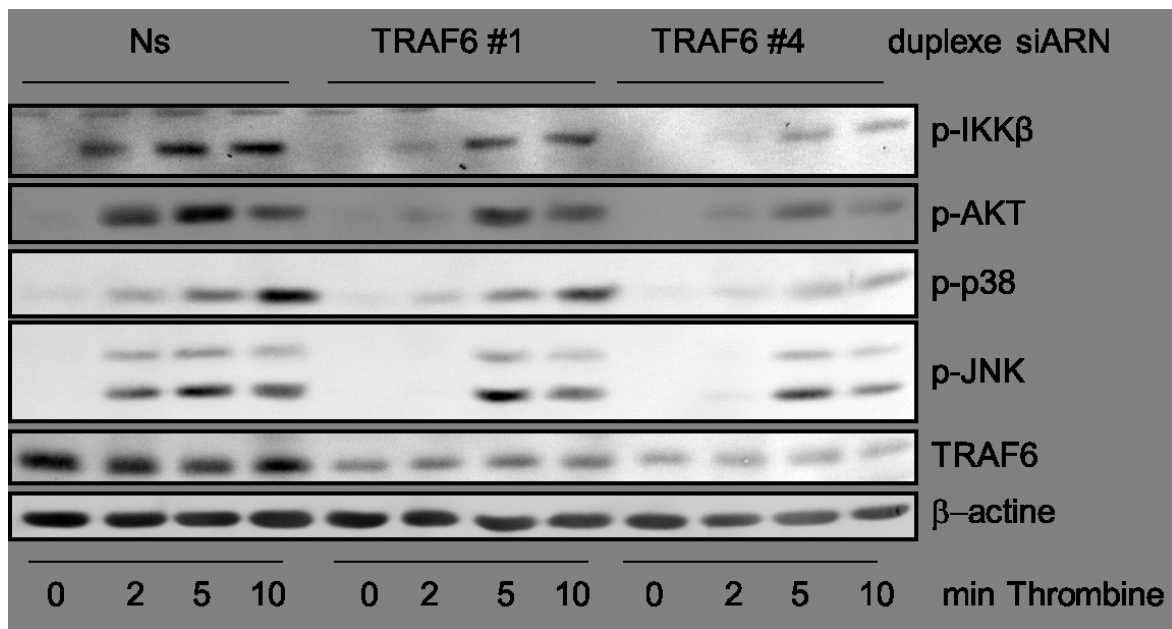


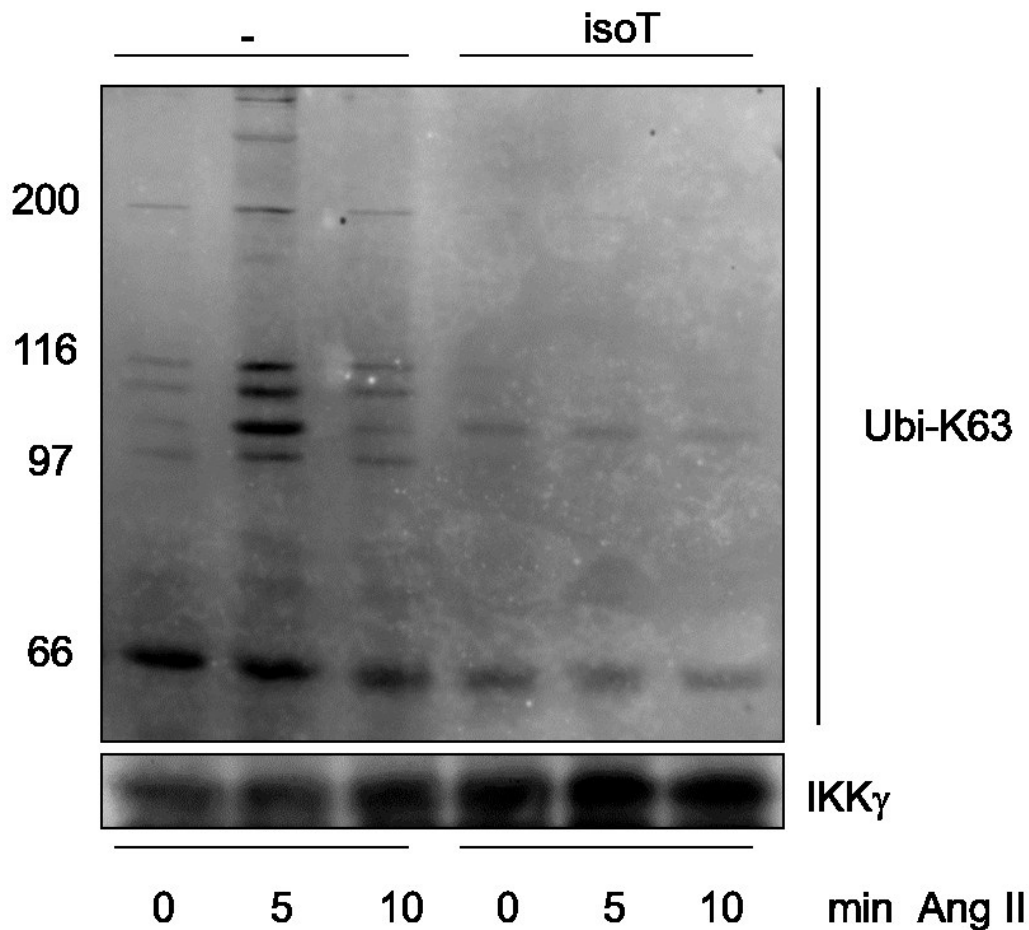
Figure. 22 : TRAF6 est impliquée dans la signalisation induite par le LPA.

Les CMLV ont été transfectées avec un duplexe de siARN contrôle (Ns) et deux différents duplexe de siARN ciblant spécifiquement TRAF6. 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été synchronisées pour 24 heures et exposées au LPA pour les temps indiqués. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardages avec les anticorps spécifiés.



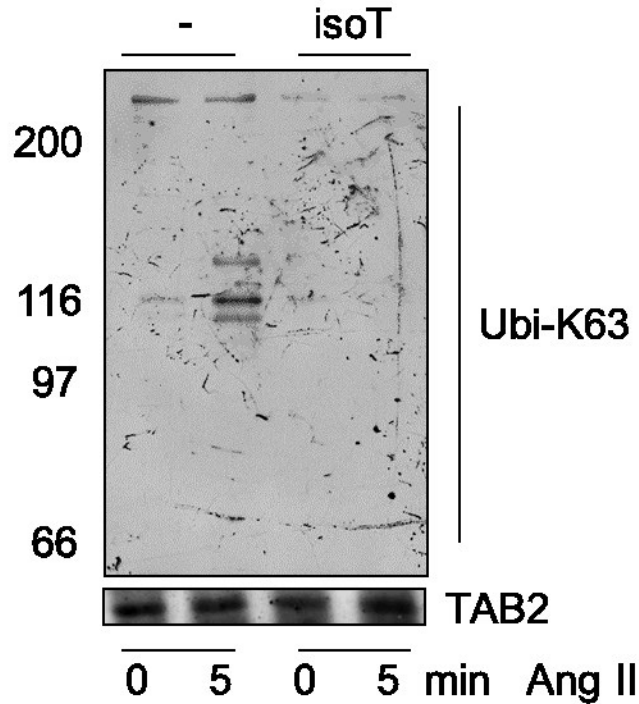
**Figure. 23 : TRAF6 est impliquée dans la signalisation induite par la thrombine.**

Les CMLV ont été transfectées avec un duplexe de siARN contrôle (Ns) et deux différents duplexe de siARN ciblant spécifiquement TRAF6. 48 heures suivant la transfection, les cellules ont été synchronisées pour 24 heures et exposées à la thrombine pour les temps indiqués. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardages avec les anticorps spécifiés.



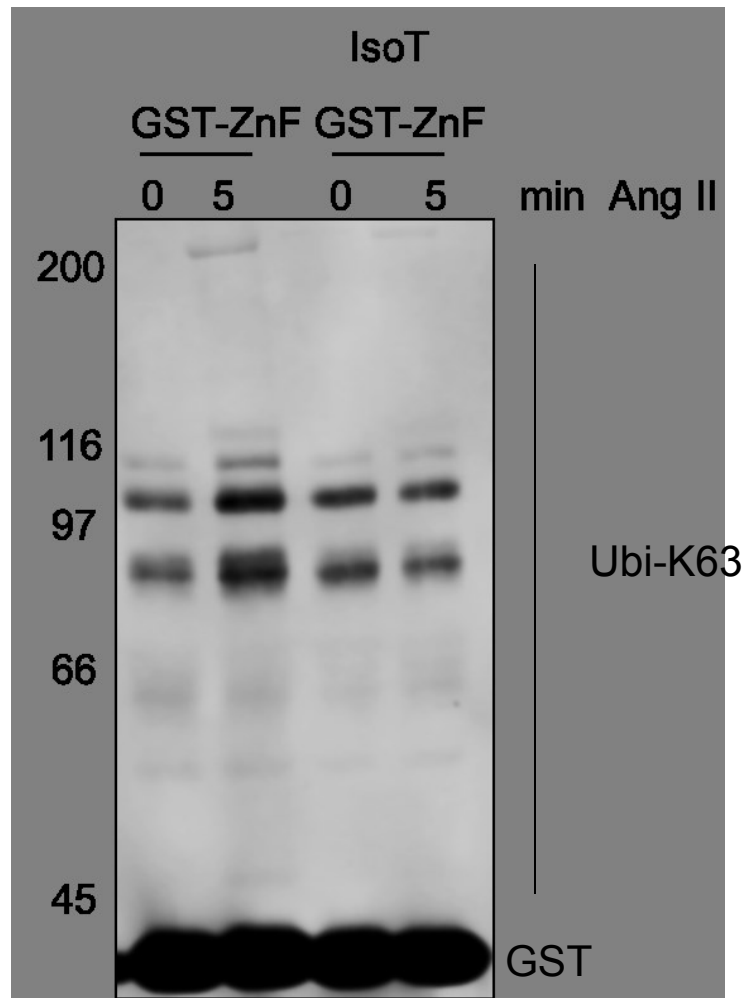
**Figure. 24 : Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à l'Ang II: IKK $\gamma$ .**

Les CMLV ont été synchronisées pendant 48 heures et exposées ensuite à 100 nM d'Ang II. Les extraits cellulaires ont été sujets à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-IKK $\gamma$ . Les extraits immunoprécipités ont été traités ou non avec l'enzyme recombinante isoT et leur état d'ubiquitination a par la suite été analysé par immunobuvardage en employant un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys 63. Le signal d'ubiquitination est totalement abrogé en présence d'isoT ce qui démontre une génération de chaînes libre de poly-Ub en Lys63. Ces chaînes ont la capacité de s'associer à IKK $\gamma$  et sont ainsi immunoprécipités.



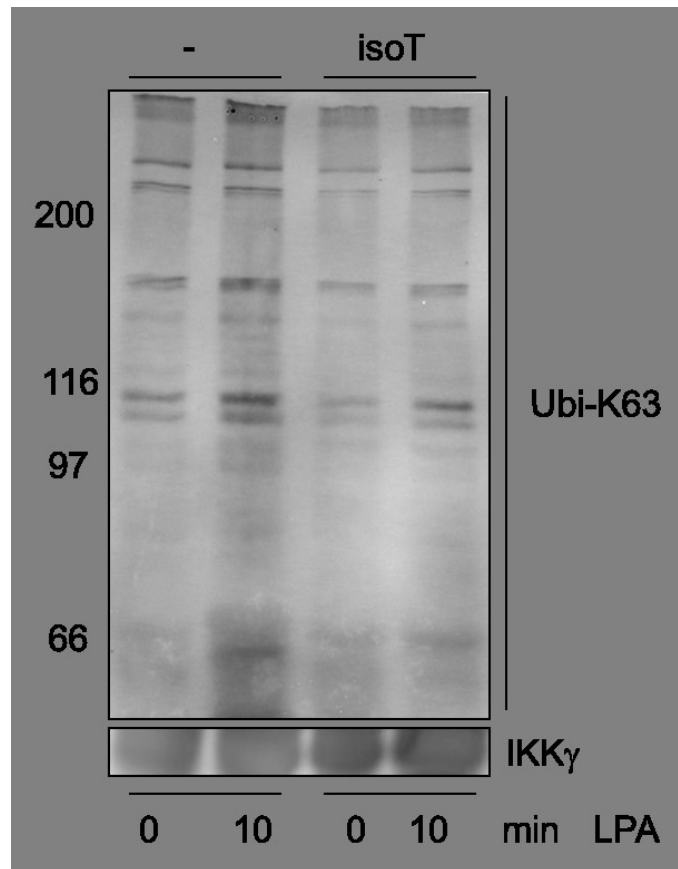
**Figure. 25: Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à l'Ang II: TAB2.**

Les CMLV ont été synchronisées pendant 48 heures et exposées ensuite à 100 nM d'Ang II. Les extraits cellulaires ont été sujets à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-TAB2. Les extraits immunoprécipités ont été traités ou non avec l'enzyme recombinante isoT et leur état d'ubiquitination a par la suite été analysé par immunobuvardage en employant un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys 63. Le signal d'ubiquitination est totalement abrogé en présence d'isoT ce qui démontre une génération de chaînes libre de poly-Ub en Lys63. Ces chaînes ont la capacité de s'associer à TAB2 et sont ainsi immunoprécipités.



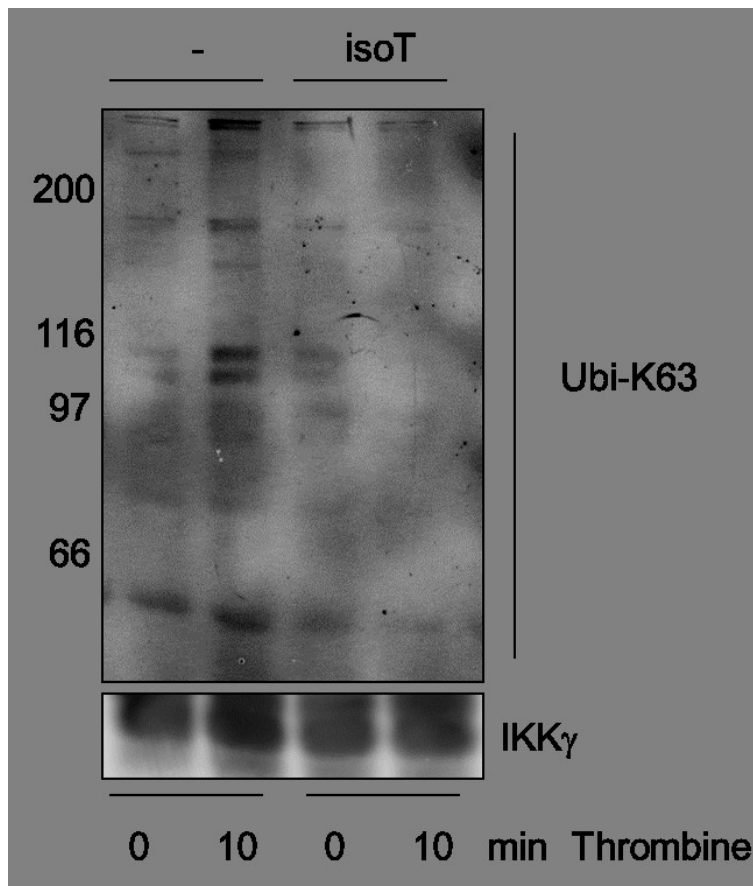
**Figure. 26: Isolation de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à l'Ang II.**

Les CMLV ont été synchronisées pendant 48 heures et exposées ensuite à 100 nM d'Ang II. Les extraits cellulaires ont été sujets à une immunoprécipitation avec la protéine recombinante GST-ZnF. Les extraits immunoprécipités ont été traités ou non avec l'enzyme recombinante isoT et leur état d'ubiquitination a par la suite été analysé par immunobuvardage en employant un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys 63. Le signal d'ubiquitination est totalement abrogé en présence d'isoT ce qui confirme que les chaînes de poly-Ub en Lys63 immunoprécipitées à l'aide du GST-ZnF sont bel et bien libres. L'essai est donc fonctionnel.



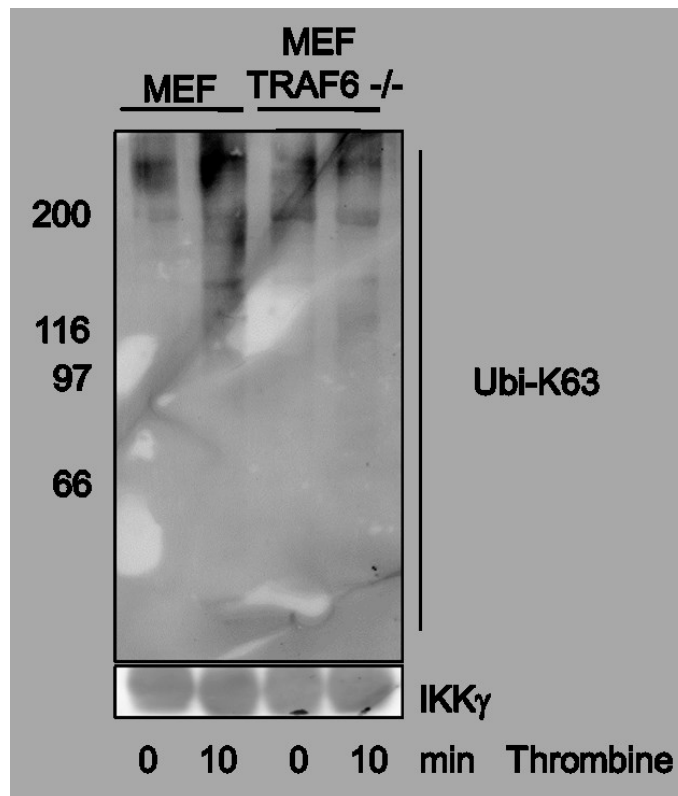
**Figure. 27 : Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées au LPA: IKK $\gamma$ .**

Les CMLV ont été synchronisées pendant 48 heures et exposées ensuite au LPA. Les extraits cellulaires ont été sujets à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-IKK $\gamma$ . Les extraits immunoprécipités ont été traités ou non avec l'enzyme recombinante isoT et leur état d'ubiquitination a par la suite été analysé par immunobuvardage en employant un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys 63. Le signal d'ubiquitination est diminué en présence d'isoT ce qui démontre une génération de chaînes libre de poly-Ub en Lys63. Ces chaînes ont la capacité de s'associer à IKK $\gamma$  et sont ainsi immunoprécipités.



**Figure. 28 : Génération de chaînes libres de poly-Ub en Lys63 dans les CMLV exposées à la thrombine: IKK $\gamma$ .**

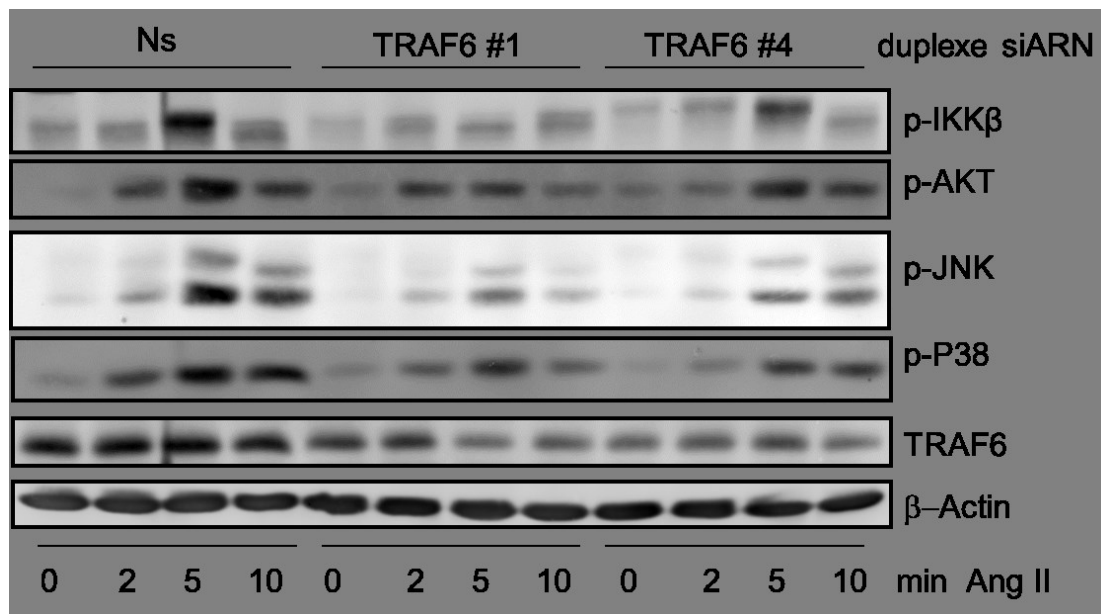
Les CMLV ont été synchronisées pendant 48 heures et exposées ensuite à la thrombine. Les extraits cellulaires ont été sujets à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-IKK $\gamma$ . Les extraits immunoprécipités ont été traités ou non avec l'enzyme recombinante isoT et leur état d'ubiquitination a par la suite été analysé par immunobuvardage en employant un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys 63. Le signal d'ubiquitination est totalement abrogé en présence d'isoT ce qui démontre une génération de chaînes libre de poly-Ub en Lys63. Ces chaînes ont la capacité de s'associer à IKK $\gamma$  et sont ainsi immunoprécipités.



**Figure. 29 : TRAF6 induit la formation de chaînes de poly-Ub en Lys63 en réponse à la thrombine: IKK $\gamma$ .**

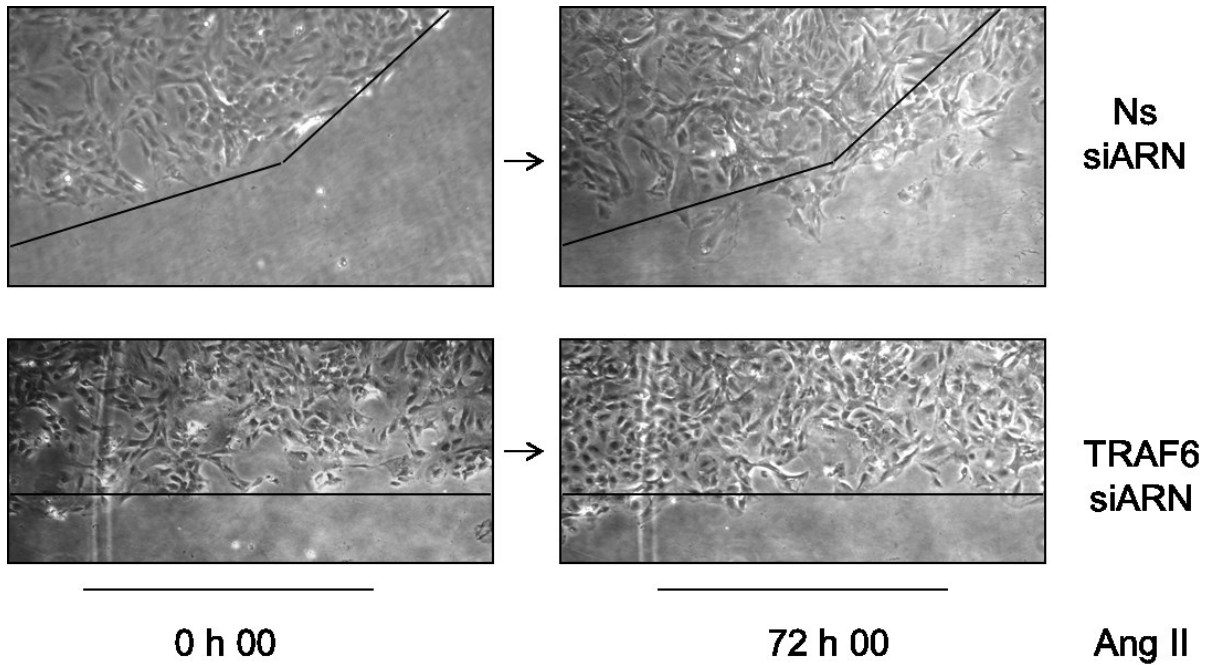
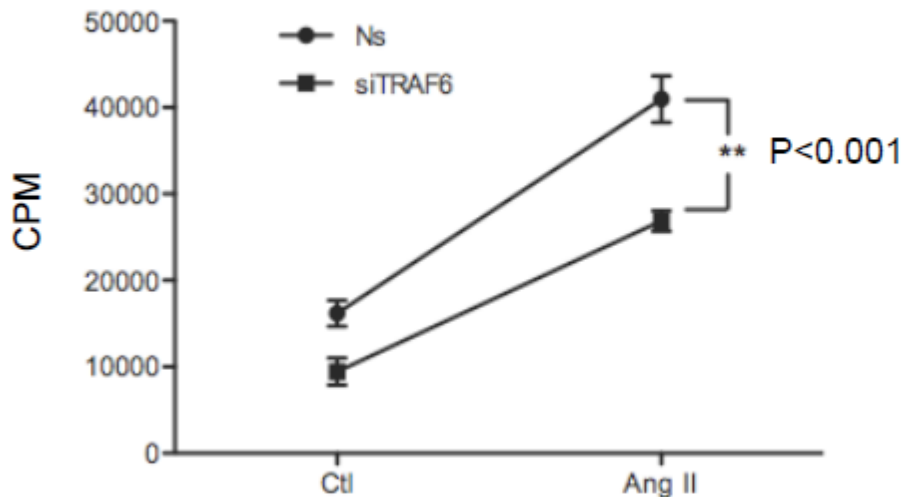
Les MEF ont été mises en absence de sérum pendant 48 heures et exposées ensuite à la thrombine. Les extraits cellulaires ont été sujets à une immunoprécipitation avec l'anticorps anti-IKK $\gamma$ . Les extraits immunoprécipités ont été analysés par immunobuvardage en employant un anticorps spécifique aux chaînes de poly-Ub en Lys 63. L'induction de l'ubiquitination est totalement inhibée dans les MEF TRAF6 -/- ce qui démontre que la génération de chaînes de poly-Ub en Lys63 est dépendante de TRAF6.





**Figure. 30 : TRAF6 est impliquée dans la signalisation induite par l'Ang II.**

Les CMLV ont été transfectées avec un duplexe de siARN contrôle (Ns) et deux différents duplexe de siARN ciblant spécifiquement TRAF6. 48 heures suivant la transfection les cellules ont été synchronisées pour 24 heures et exposées à 100 nM d'Ang II pour les temps indiqués. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardages avec les anticorps spécifiés.

**A****B**

**Figure. 31 : TRAF6 est impliquées dans les réponses physiologiques des CMLV exposées à l'Ang II.**

Les CMLV ont été transfectées avec un duplexe de siARN contrôle (Ns) et un duplexe de siARN ciblant spécifiquement TRAF6. 48 heures suivant la transfection les cellules ont été synchronisées pour 24 heures. A) Suivant la synchronisation des CMLV, une strie médiane fut effectuée au niveau de la monocouche cellulaire afin de visualiser la migration des CMLV en réponse à 100 nM d'Ang II à l'aide d'un microscope à contraste de phase. B) Suivant la synchronisation des CMLV, les cellules ont été exposées à 100 nM d'Ang II en présence de leucine tritiée afin de mesurer la synthèse protéique.

## 2.0 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

Le remodelage vasculaire hypertrophique correspond à l'accroissement de la densité de tissus retrouvés dans la paroi vasculaire. Elle est occasionnée par l'hypertrophie cellulaire et/ou l'hyperplasie. L'hypertrophie cellulaire est définie par l'augmentation de la taille des cellules liée à une augmentation de la synthèse protéique tandis que l'hyperplasie est définie par une augmentation du nombre de cellules liée au processus de division cellulaire. [324] L'implication des CMLV dans le remodelage vasculaire hypertrophique fut irréfutable dès son identification. Par contre, le ou les processus par lesquels les CMLV participaient à ce remodelage furent un sujet de débat dans les années 1970-1980. Certains chercheurs estimaient en effet que seule l'hyperplasie des CMLV était impliquée dans le remodelage vasculaire hypertrophique, tandis que d'autres affirmaient que l'hypertrophie des CMLV était seule responsable. Le Dr. Owens GK fut l'un des premiers chercheurs à apporter des éléments de réponse à cette question. Selon ses travaux, le remodelage hypertrophique au niveau d'un modèle animal hypertendu est associé à l'hypertrophie des CMLV tandis qu'il est associé à l'hyperplasie au niveau d'un modèle animal où de sévères lésions à la vasculature sont provoquées. [325] Par conséquent, le type de croissance qu'adoptent les CMLV au sein de la vasculature dépend de la nature du stress qu'elles subissent. Le remodelage vasculaire hypertrophique fait donc intervenir tant l'hypertrophie cellulaire que l'hyperplasie. En ce qui a trait au modèle animal hypertendu, une hypothèse fut émise selon laquelle l'hypertrophie des CMLV était seulement occasionnée par l'élévation de la pression artérielle. Elle fut toutefois infirmée à la suite de l'administration en parallèle d'un inhibiteur d'ACE et d'un relaxant musculaire à des rats hypertendus. Malgré une diminution de la tension artérielle équivalente pour les deux traitements, l'inhibiteur d'ACE fut hautement plus efficace que le relaxant musculaire pour la diminution du taux de synthèse protéique par les CMLV ainsi que pour la diminution de la masse totale de CMLV retrouvée dans la section intima-média. [326] Des recherches subséquentes ont démontré que l'Ang II est un agent hypertrophiant, mais non hyperplasique. Or, en présence

d'autres facteurs de croissance, l'Ang II peut potentialiser l'hyperplasie cellulaire. [327]

Le remodelage vasculaire hypertrophique associé à l'Ang II fait intervenir notamment des mécanismes inflammatoires et hypertrophiques au sein des CMLV. Notre première étude a adressé le processus inflammatoire induite par l'Ang II dans les CMLV. En ce qui concerne l'hypertrophie des CMLV, des protéines couplant l'axe Ang II/AT1 à ce phénomène ont été identifiées, dont la protéine SRC, la protéine focal adhesion kinase (FAK), les protéines Janus family kinase (JAK) et la protéine Proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2). [328] L'activation de ces dernières est notamment sous la gouverne des seconds messagers ROS et PKC. [58] Une fois activée elles agissent en amont des voies phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)-AKT et MEK1/2-ERK1/2-Mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase-1 (Mnk1)-eIF4E afin de stimuler la synthèse protéique des CMLV dépendante de l'Ang II. [329-332] Par contre, malgré ces quelques connaissances, les mécanismes moléculaires couplant l'axe Ang II/AT1 à l'hypertrophie des CMLV restent obscurs. En effet, la participation relative de chacune de ces voies est inconnue et des protéines essentielles à l'activation de la synthèse protéique continuent d'être identifiées, d'où l'intérêt de poursuivre les recherches en ce sens. [333] Subséquemment à de telles recherches, Lee *et al.*, ont démontré que le TNF $\alpha$  a la capacité de contrôler les mécanismes d'initiation de la traduction suivant l'activation d'IKK $\beta$  dans des cellules cancéreuses du sein. En effet, cette sous-unité du complexe IKK phosphoryle la protéine TSC1 afin d'inhiber son interaction avec TSC2 et ainsi permette l'activation de mTORC1. [266] Cette découverte nous a enclin à étudier la participation d'IKK $\beta$  au niveau de l'hypertrophie des CMLV dépendante de l'Ang II. Cette investigation a donné lieu à un second article que j'ai publié en collaboration avec ma collègue Wendy J. van Zuylen et mon directeur de recherche Dr. Marc Servant qui s'intitule *Role of I $\kappa$ B kinase- $\beta$  in the growth-promoting effects of angiotensin II In Vitro and In Vivo*. [284] Cette étude a une incidence sur la biologie moléculaire, car une nouvelle voie de signalisation couplant l'axe Ang II/AT1 à l'hypertrophie des CMLV y est révélée, soit la voie Ang II-AT1-IKK $\beta$ -TSC1/TSC2-mTORC1-S6K1/4E-BP1. De plus, elle dénote une envergure

intéressante pour la recherche translationnelle puisqu'il y est démontré que le positionnement moléculaire d'IKK $\beta$  est opportun. En effet, nous illustrons que le complexe IKK est en amont autant de la réponse inflammatoire que de la réponse hypertrophique dépendante de l'Ang II dans les CMLV, soit deux événements participant au remodelage vasculaire hypertrophique caractéristique de certaines maladies cardiovasculaires, dont l'hypertension et l'athérosclérose.

## 2.1 Étude *in vitro*

La sous-unité TSC1 du complexe TSC1/TSC2 possède une séquence consensus en acides aminés reconnue par IKK $\beta$ . Les deux sites phosphoaccepteurs de cette kinase correspondent aux résidus sérines en position 487 et 511. De là, Lee *et al.*, ont adressé la potentialité que TSC1 soit un nouveau substrat de cette kinase. Ils ont démontré via un essai kinase *in vitro* que TSC1 est bel et bien un substrat direct d'IKK $\beta$  en réponse au TNF $\alpha$ . [266] Nous avons donc effectué un tel essai afin de déterminer si TSC1 est un substrat d'IKK $\beta$  en réponse à l'Ang II dans les CMLV. Lorsqu'isolée de CMLV exposées à l'Ang II, la kinase IKK $\beta$  a effectivement la capacité de phosphoryler une protéine recombinante représentant TSC1. La mutation de la sérine 511 en alanine (S511A) au sein de cette dernière abroge totalement la capacité d'IKK $\beta$  à phosphoryler TSC1. (ATVB Figure. 2A-B) Cette observation démontre la véracité et la spécificité de l'essai puisqu'IKK $\beta$  ne phosphoryle pas d'autres sites phosphoaccepteurs à tout hasard, mais bien un résidu situé dans sa séquence consensus. D'autre part, l'intensité du signal phosphotransférase détectée suivant un essai kinase est beaucoup plus faible lorsque les substrats naturels de la kinase sont employés plutôt que des substrats synthétiques. Un substrat naturel hautement caractérisé pour une kinase donnée peut donc être employé lors de l'essai afin de déterminer l'efficacité de l'activité phosphotransférase de cette même kinase vis-à-vis un substrat plus ou moins bien caractérisé. [334] En ce qui concerne notre essai kinase, l'activité phosphotransférase d'IKK $\beta$  envers TSC1 est de même intensité qu'envers son substrat le plus caractérisé, soit I $\kappa$ B $\alpha$ . (ATVB Figure. 2A) Cette observation témoigne de l'envergure que peut potentiellement occuper l'axe Ang II-AT1-IKK $\beta$ -TSC1/TSC2 dans les CMLV exposées à l'Ang II.

Afin de déterminer si IKK $\beta$  détient une fonction vis-à-vis la phosphorylation endogène de TSC1 en réponse à l'Ang II dans les CMLV en culture nous avons employé la technologie short hairpin RNA (shARN). L'atténuation de l'expression d'IKK $\beta$  par deux différents shARN dans les CMLV diminue non seulement la phosphorylation de TSC1 en sérine 511, mais également la phosphorylation des protéines S6K1 et 4E-BP1, soit deux effecteurs directement impliqués dans la synthèse protéique. (ATVB Figure. 2C-D) Nous sommes confiants vis-à-vis ces résultats puisque plusieurs techniques ont été employées afin de les valider. En effet, les résultats précédents sont supportés par une approche pharmacologique. Le composé chimique N-(6-chloro-7-methoxy-9H- $\beta$ -carbolin-8-yl)-2 methylnicotinamide (ML120B) est un inhibiteur sélectif d'IKK $\beta$ . Son efficacité vis-à-vis l'inhibition de la réponse inflammatoire dépendante de la voie canonique de NF- $\kappa$ B a été précédemment illustrée. En effet, il a été démontré que la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B en réponse au TNF $\alpha$  est fortement diminuée par le ML120B dans les lymphocytes. [335] Nous avons fait preuve de clairvoyance puisque préalablement à l'analyse de l'effet du ML120B au niveau de l'état de phosphorylation de TSC1 et au niveau de la synthèse protéique, nous avons vérifié que ce composé était efficace au sein de notre modèle de CMLV en analysant tout d'abord la réponse inflammatoire. En effet, il n'a jamais été démontré qu'IKK $\beta$  est impliquée dans la réponse hypertrophique des CMLV. Ainsi, puisque cette affirmation n'a jamais été répertoriée et qu'elle est importante, nous nous sommes assurés de la qualité de nos expérimentations afin de ne pas omettre une observation qui aurait été occasionnée par l'inefficacité du composé chimique dans les CMLV. Nous démontrons ainsi que dans notre modèle cellulaire le ML120B diminue efficacement la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  induite par le TNF $\alpha$  et l'expression du marqueur inflammatoire VCAM-1 induite par l'Ang II. (ATVB Supplemental Figure I) Cet inhibiteur a donc été employé avec certitude pour la détermination de la fonction d'IKK $\beta$  dans la réponse hypertrophique des CMLV dépendante de l'Ang II. Tout comme les shARN, le ML120B diminue la phosphorylation de TSC1 en sérine 511 et amenuise la phosphorylation des protéines S6K1 et 4E-BP1 au sein des CMLV exposées à l'Ang II. (ATVB Figure. 3A-D) De plus, l'inhibiteur atténue la phosphorylation de mTOR. (ATVB Figure. 3A-B) La

diminution de la phosphorylation de cette kinase représente nécessairement la réduction de son activité phosphotransférase puisque l'anticorps employé pour visualiser cette modification post-traductionnelle est spécifique au résidu phosphorylé lors du mécanisme d'autophosphorylation qui survient uniquement lorsque mTOR est actif. [336] Également, la diminution de la phosphorylation de mTOR parallèle la réduction de ces principaux substrats, soit S6K1 et 4E-BP1.

Il a été démontré que mTOR est activé lorsqu'il y a une élévation du taux de dissociation entre TSC1 et TSC2 puisque le découplage de ces deux protéines diminue l'effet inhibiteur du complexe TSC1/TSC2 vis-à-vis cette kinase. Par ailleurs, cette réduction d'association dépend de la phosphorylation de TSC1. [266] Ainsi, nos résultats démontrant que l'atténuation de la phosphorylation de TSC1 en sérine 511 corrèle avec la réduction de l'activité phosphotransférase de mTOR lorsque l'activité d'IKK $\beta$  est diminuée dans les CMLV exposées à l'Ang II, semblent suggérer qu'IKK $\beta$  phosphoryle TSC1 en réponse à l'Ang II dans le but d'accroître la cinétique de dissociation entre TSC1 et TSC2 afin d'induire l'activation de mTOR et conséquemment la synthèse protéique. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le ML120B diminue de manière dose-dépendante la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV. (ATVB Figure. 4A) De plus, l'IC<sub>50</sub> du ML120B vis-à-vis la synthèse protéique dépendante de l'Ang II correspond à 10.6  $\mu$ M, soit la concentration qui abolit environ 50% de la phosphorylation des protéines TSC1 et S6K1. Il y a donc une corrélation entre les résultats obtenus par immunobuvardages et ceux obtenus par essais physiologiques, ce qui concrétise les observations résultant de chacune de ces techniques. Une seconde approche a été employée, soit la technologie shARN afin de consolider les conclusions acquises avec l'inhibiteur pharmacologique pour la synthèse protéique. En effet, la diminution de l'expression d'IKK $\beta$  abroge drastiquement cette dernière dans les CMLV exposées à l'Ang II. (ATVB Figure. 4B) Ces observations appuient donc la participation de l'axe Ang II-AT1-IKK $\beta$ -TSC1/TSC2-mTORC1-S6K1/4E-BP1 dans la réponse hypertrophique des CMLV. Nous avons tout de même fait preuve de prudence vis-à-vis nos réflexions puisque malgré ces dernières observations probantes, nous avons effectué d'autres expériences pour vérifier qu'IKK $\beta$  agit bel et bien en amont de TSC1 afin d'induire la

réponse hypertrophique dépendante de l'Ang II. Effectivement, nous démontrons que la surexpression de la protéine TSC1 S511A compromet sévèrement la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV. (ATVB Figure. 4C) Cet effet draconien du mutant de TSC1, dont le site consensus d'IKK $\beta$  est muté, confirme que cette kinase participe effectivement à la réponse hypertrophique des CMLV exposées à l'Ang II via sa capacité à phosphoryler TSC1.

Toutefois, la diminution drastique de la synthèse protéique suivant la diminution de l'expression d'IKK $\beta$  par la technologie shARN et suivant la surexpression du mutant TSC1 S511A a été accueillie avec scepticisme par certains chercheurs. En effet, plusieurs articles démontrent que l'axe Ang II/AT1 induit l'activation des protéines SRC, FAK, JAK, PYK2, AKT et/ou Mnk1 afin d'engendrer la synthèse protéique dépendante de mTORC1 au sein des CMLV. Par contre, nos résultats semblent révoquer leur implication dans l'induction de l'hypertrophie. Nous affirmons cependant que nos découvertes ne minimisent aucunement la contribution des cascades de signalisation caractérisées par d'autres équipes de recherche pour l'activation de mTORC1 en réponse à l'Ang II. En effet, nous proposons plutôt que les voies hypertrophiques sous la gouverne de l'axe Ang II/AT1 pourraient converger à l'activation d'IKK $\beta$ , puisqu'il a été démontré que les ROS, Src et PYK2 agissent tous en amont d'IKK $\beta$  afin d'induire une réponse inflammatoire dépendante de NF- $\kappa$ B. [337,338] D'autre part, la voie de signalisation PI3K/PDK1-AKT couplant l'Ang II à la synthèse protéique a été identifiée dans des cellules musculaires lisses issues d'artères coronaires humaines. Or, notre étude est effectuée dans des cellules musculaires lisses issues d'aortes humaines. Il a précédemment été démontré que les effets cellulaires engendrés par certains stimuli diffèrent chez ces deux types cellulaires. [339,340] De plus, une telle disparité cellulaire pour l'activation de mTORC1 en réponse au TNF $\alpha$  a été observée. En effet, il a été déterminé que l'activation de mTORC1 en réponse au TNF $\alpha$  est dépendante d'IKK $\beta$  et indépendante d'AKT en ce qui a trait à deux lignées cellulaires cancéreuses du sein tandis que l'activation de mTORC1 en réponse au TNF $\alpha$  est dépendante d'AKT et indépendante d'IKK $\beta$  au niveau, notamment, de cellules embryonnaires de reins humaines. [341] Ainsi, AKT est possiblement non requis pour la réponse hypertrophique dépendante



de l'Ang II dans les cellules aortiques, mais essentielle pour ce processus dans les cellules coronaires. Finalement, bien que la stratégie shARN ciblant IKK $\beta$  et la surexpression de TSC1 S511A diminue drastiquement la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV d'aortes humaines, il y a tout de même une incorporation résiduelle de leucine tritiée de 24% et 22% respectivement. Or, il a été démontré que la voie MEK1/2-ERK1/2 est nécessaire, mais insuffisante pour une réponse hypertrophique complète des CMLV aortiques exposées à l'Ang II. [342] Nous avons donc émis l'hypothèse que la synthèse protéique résiduelle d'environ 25% était occasionnée par la voie MEK1/2-ERK1/2. Cette déduction s'avérera exacte puisque nous démontrons que la combinaison du ML120B et d'un inhibiteur de MEK1/2 inhibe complètement la synthèse protéique des CMLV exposées à l'Ang II. (ATVB Supplemental Figure IV) Ainsi, puisque l'inhibition de la voie Ang II-AT1-IKK $\beta$ -TSC1/TSC2-mTORC1-S6K1/4E-BP1 en conjonction à l'inhibition de la voie MEK1/2-ERK1/2 inhibent totalement la synthèse protéique, ceci confirme la potentialité que les protéines précédemment décrites pour l'hypertrophie des CMLV en réponse à l'Ang II convergent à IKK $\beta$  et que la voie AKT soit bel et bien cellules-spécifiques tout comme le TNF $\alpha$ .

## 2.2 Étude *in vivo*

Notre étude décrit donc une nouvelle voie de signalisation couplant l'axe Ang II/AT1 à l'hypertrophie des CMLV. Qui plus est, nous affirmons qu'IKK $\beta$  est située en amont des réponses inflammatoires et hypertrophiques dépendantes de l'Ang II *in vitro*, soit deux événements impliqués dans le remodelage vasculaire hypertrophique qui résulte généralement à des dommages aux organes cibles. Ainsi, afin de démontrer qu'IKK $\beta$  occupe bel et bien ce positionnement *in vivo*, nous avons administré à des rats de l'Ang II en conjonction ou non avec le ML120B et nous avons par la suite évalué l'état inflammatoire et hypertrophique de l'aorte et des artères mésentériques. Nous avons fait preuve de discernement puisque les résultats concernant les processus moléculaires obtenus au sein des CMLV aortiques humaines n'ont pas été extrapolés aux CMLV aortiques de rats. En effet, nous nous sommes assurés de la reproductibilité de nos résultats au niveau de ces dernières

préalablement à nos expériences *in vivo* puisque les processus moléculaires associés à un agoniste donné peuvent potentiellement varier d'une espèce à l'autre. Or, les résultats obtenus des CMLV aortiques de rats vis-à-vis le ML120B sont identiques à ceux obtenus des CMLV aortiques humaines. (ATVB Supplemental Figure II) Nous nous sommes donc retrouvés dans une situation privilégiée pour étudier le rôle d'IKK $\beta$  *in vivo* en réponse à l'Ang II. L'exactitude de nos conclusions quant à une fonction directe de l'Ang II sur les cellules de la vasculature repose sur le fait que nous démontrons que la dose injectée de l'octapeptide n'influence aucunement les paramètres hémodynamiques. (ATVB Table 1) En effet, ces derniers peuvent induire dans certains cas des effets inflammatoires et hypertrophiques au niveau de la vasculature indépendamment de la signalisation induite par l'Ang II. [126] Nous avons également déterminé que l'injection du ML120B n'affecte pas ces mêmes paramètres. Ainsi, nous affirmons que la diminution de la synthèse protéique induite par l'Ang II dans l'aorte et les artères mésentériques est occasionnée par l'inhibition de l'activité d'IKK $\beta$ . (ATVB Figure. 5A-B) Or, contrairement à l'aorte, nous observons que la synthèse protéique dans les artères mésentériques n'est pas complètement inhibée par le ML120B. Ceci peut potentiellement s'expliquer par le fait que les artères mésentériques sont sujettes à une combinaison de remodelage vasculaire eutrophique et hypertrophique, à la différence de l'aorte qui n'est sujette qu'au remodelage vasculaire hypertrophique. [343] En effet, malgré l'absence de croissance cellulaire au cours du remodelage vasculaire eutrophique, il y a tout de même présence de synthèse protéique. À titre d'exemple, la déposition versus la dégradation de la matière formant la matrice extracellulaire tend à s'équilibrer au cours de ce processus. Il y a donc une constante production de protéines matricielles et de MMPs par les cellules de la vasculature. L'Ang II participe à ce phénomène en partie via l'activation de la protéine NADPH-oxidase dans les CMLV, soit une voie indépendante d'IKK $\beta$ . [344] Ainsi, la diminution de la synthèse protéique dans les artères mésentériques des rats suivant un traitement avec le ML120B est probablement due à l'inhibition de l'hypertrophie cellulaire associée à IKK $\beta$  et la synthèse protéique résiduelle due notamment à la maintenance de la matrice.

Fait important, en plus de la diminution de la synthèse protéique, un marqueur de la réponse inflammatoire induite par l'Ang II, soit VCAM-1 est également diminuée par le ML120B dans le tissu aortique. (ATVB Figure. 5C-D) Ainsi, nous suggérons IKK $\beta$  en tant que cible thérapeutique pour les maladies liées au remodelage vasculaire hypertrophique puisque les résultats *in vivo* dénotent que cette protéine est en amont de l'inflammation et de l'hypertrophie des CMLV, soit deux des principaux phénomènes à l'origine de ce processus.

### **2.3 Implications thérapeutiques : Accent sur l'athérosclérose**

L'angioplastie artérielle est indiquée pour traiter les rétrécissements ou les obstructions des vaisseaux sanguins dont l'origine est l'athérosclérose. Cette dernière est une intervention non chirurgicale qui consiste à insérer au sein de la vasculature un maillon métallique nommée endoprothèse qui a pour fonction d'accroître le diamètre de la lumière du vaisseau rétréci par l'athérome. [345] Les endoprothèses peuvent-être médicamenteuses ou non. Si elles le sont, les drogues qui les imbibent sont employées afin de prévenir le processus de revascularisation suivant l'angioplastie et/ou afin de diminuer le remodelage vasculaire. La majorité des médicaments enrobant les endoprothèses sont des analogues de la rapamycine puisque ces derniers inhibent mTORC1 et par conséquent la prolifération ainsi que l'hypertrophie des CMLV au sein de l'intima. [346,347] Il a cependant été démontré que les endoprothèses imbibées de ce type de drogue sont inefficaces vis-à-vis la diminution de la progression de l'athérosclérose puisque bien qu'ils diminuent le remodelage vasculaire dépendant de la croissance, ils accroissent le remodelage vasculaire dépendant de l'inflammation. [348] Ainsi, notre affirmation selon laquelle IKK $\beta$  est une cible thérapeutique à préconiser afin de réduire le développement de l'athérosclérose est justifiée puisque cette kinase est en amont autant des réponses inflammatoires que des réponses hypertrophiques des CMLV engendrées par l'Ang II et potentiellement par d'autres déterminants pathologiques, tels le LPA et les LDL. [180,284,349] Qui plus est, une analyse statistique effectuée en 2013 sur une cohorte de 6440 patients ayant subi une intervention coronarienne percutanée a été effectuée afin de comparer les taux de mortalité et de revascularisation entre les patients dont

l'endoprothèse insérée au niveau de la vasculature est non médicamentée versus les patients où elle est imbibée de sirolimus, un analogue de la rapamycine. Les résultats démontrent que le sirolimus diminue efficacement la revascularisation seulement au cours de la première année. En effet, suivant ce délai la revascularisation est similaire entre les patients ayant reçu une endoprothèse médicamentée ou non médicamentée. Aucune différence n'a été reportée en ce qui concerne le taux de mortalité. [350] De plus, il a été postulé que les endoprothèses médicamentées avec différents analogues de la rapamycine sont associées à un risque élevé de thrombose à long terme comparativement aux endoprothèses non médicamentées. [351,352] Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cet effet indésirable ne sont pas très bien élucidés. Par contre, une étude parue en 2013 démontre que la rapamycine et ses analogues induisent l'inhibition du facteur de transcription KLF2 et conséquemment un déséquilibre au niveau de l'expression des gènes pro- et anti-thrombotiques. [353] Ainsi, les drogues ciblant mTORC1 imbibant les endoprothèses ne sont pas spécifiques et ne sont pas efficaces pour l'amenuisement de la progression de l'athérosclérose ainsi que pour la diminution des taux de mortalité et de revascularisation associés à l'angioplastie.

En ce qui a trait aux inhibiteurs des protéines en aval de mTORC1, telle la protéine S6K1, les résultats de criblages à haut débit ayant identifié des drogues la ciblant ont paru en octobre 2013. [354] Ces molécules chimiques ne seront donc pas administrées à des humains au cours d'essais cliniques dans un futur rapproché. Ceci confère un autre avantage en faveur d'IKK $\beta$  en tant que cible thérapeutique puisque le premier composé chimique ciblant cette protéine, le MLN-0415, a atteint les essais cliniques humains en 2006. Ce composé a été développé afin de contrer la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires de l'intestin. Il a complété avec succès une étude clinique de Phase I à dose unique ascendante, mais a été rejeté suivant une étude clinique de Phase I à doses multiples ascendantes dû à un profil de risques défavorable. [355] Or, la compagnie Sanofi-Aventis a développé un composé prometteur, le SAR-113945. Cette molécule chimique est indiquée pour l'ostéoarthrite et les douleurs articulaires associées. Elle n'est cependant pas administrée systématiquement, mais localement au niveau intra-articulaire. Le SAR-

113945 a complété avec succès la totalité d'une étude clinique de Phase I. L'étude clinique de Phase II s'est terminée au cours de l'année 2013, cependant les résultats n'ont pas encore été dévoilés publiquement. [355] Ce composé a été administré localement, car il n'est pas certain que l'inhibition systémique d'IKK $\beta$  soit tolérée par l'organisme. Notamment, il a été démontré que cette dernière est cruciale dans la réponse immunitaire. En outre, la délétion d'IKK $\beta$  dans les cellules myéloïdes de souris et son inhibition systémique par un composé pharmacologique a augmenté grandement la susceptibilité de ces dernières à subir un choc-septique mortel en réponse à des endotoxines. [356] De plus, son inactivation naturelle est associée à certaines maladies, dont l'ataxie télangiectasie et le lupus érythémateux. [357] Ceci étant, malgré ces faits, le potentiel thérapeutique d'IKK $\beta$  vis-à-vis l'athérosclérose et le remodelage vasculaire associé aux dommages des organes cibles, dont le cœur, le rein, l'œil et le cerveau ne doit pas être banni. Il s'agit plutôt de développer des stratégies innovantes afin de cibler spécifiquement les tissus lésés. Les endoprothèses, les nanoparticules ainsi que les thérapies géniques où l'expression du transgène est tissu-spécifique en sont quelques exemples. [358,359] Ainsi, IKK $\beta$  se trouve dans un contexte favorable pour être ciblée rapidement chez l'humain puisqu'un inhibiteur d'IKK $\beta$  a atteint une étude clinique de Phase II, que les endoprothèses sont hautement employées et que notre étude positionne IKK $\beta$  en amont des réponses hypertrophiques et inflammatoires des CMLV dépendantes de l'Ang II et potentiellement dépendantes d'autres facteurs de risque du remodelage vaculaire.

## **2.4 Perspectives et résultats préliminaires les appuyant**

Nos précédentes études illustrent qu'IKK $\beta$  est une cible à préconiser au niveau des maladies cardiovasculaires associées au SRAA, dont l'athérosclérose. Or, nous en avons pas fait directement la preuve. Ceci nous a donc conduit à une nouvelle étude dont l'objectif est de déterminer si l'élimination spécifique de l'expression d'IKK $\beta$  au niveau des cellules du muscle lisse (CML) *in vivo* est suffisante en premier lieu pour diminuer les plaques athéromateuses et en second lieu pour induire leur régression. Cette nouvelle étude a débuté par la génération de souris où le gène

codant pour IKK $\beta$  est supprimé seulement dans leurs CML selon un mécanisme inductible au tamoxifène. Ces dernières souris ont également un profil *ApoE*<sup>-/-</sup>, soit le seul modèle expérimental où l'athérosclérose se développe spontanément, c'est-à-dire sans l'apport d'un régime alimentaire athérogène. Or, une diète riche en lipides et/ou l'administration d'Ang II à une concentration où les paramètres hémodynamiques ne sont pas affectés accélèrent la progression de la pathologie chez les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>. [360] Ainsi, dans le but de répondre à l'objectif de notre nouvelle étude, le développement de l'athérosclérose sera induit par l'administration d'Ang II chez les souris transgéniques nouvellement générées, soit les *SMA-CreER*<sup>T2</sup>*IKK $\beta$* <sup>Flox/Flox</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> et les conséquences de l'élimination spécifique de l'expression d'IKK $\beta$  dans les CML au niveau de l'évolution des plaques athéromateuses seront déterminées.

Afin de s'assurer que le tamoxifène diminue bel et bien l'expression d'IKK $\beta$  dans les CML des souris transgéniques, nous avons isolé des CMLV de leur aorte et les avons exposées à ce composé chimique. Le tamoxifène induit une diminution significative de l'expression d'IKK $\beta$  au niveau des CMLV mises en culture. (Figure. 32 A) Qui plus est, l'amenuisement de l'expression d'IKK $\beta$  au sein de ces CMLV en réponse à l'Ang II abroge complètement la phosphorylation de TSC1 en sérine 511 ce qui confirme les conclusions obtenues de notre précédente étude. (Figure. 32 B) Des expériences contrôles ont également été effectuées *in vivo* afin de démontrer que la concentration d'Ang II administrée ainsi que la suppression d'IKK $\beta$  dans les CML des souris *SMA-CreER*<sup>T2</sup>*IKK $\beta$* <sup>Flox/Flox</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> n'ont aucun effet sur les paramètres hémodynamiques excluant ainsi une incidence indirecte de ces derniers sur le développement de l'athérosclérose. À cette concentration subpressive, l'Ang II induit le développement de plaques athérosclérotiques chez les souris *SMA-CreER*<sup>T2</sup>*IKK $\beta$* <sup>Flox/Flox</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> impliquant ainsi le SRAA vasculaire dans ce processus. (Figure. 33 A, C) Nous avons obtenu des résultats préliminaires prometteurs au cours de l'optimisation des conditions expérimentales. Nous avons en effet observé que l'administration de tamoxifène, et donc l'élimination de l'expression d'IKK $\beta$ , dans les CML, préalablement à l'administration d'Ang II chez les souris *SMA-CreER*<sup>T2</sup>*IKK $\beta$* <sup>Flox/Flox</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> diminue le développement de l'athérosclérose. (Figure.

33 A-D) Ces résultats, bien que préliminaires, appuient l'éventualité que l'inhibition spécifique d'IKK $\beta$  dans les CMLV humaines diminue le développement de cette pathologie.

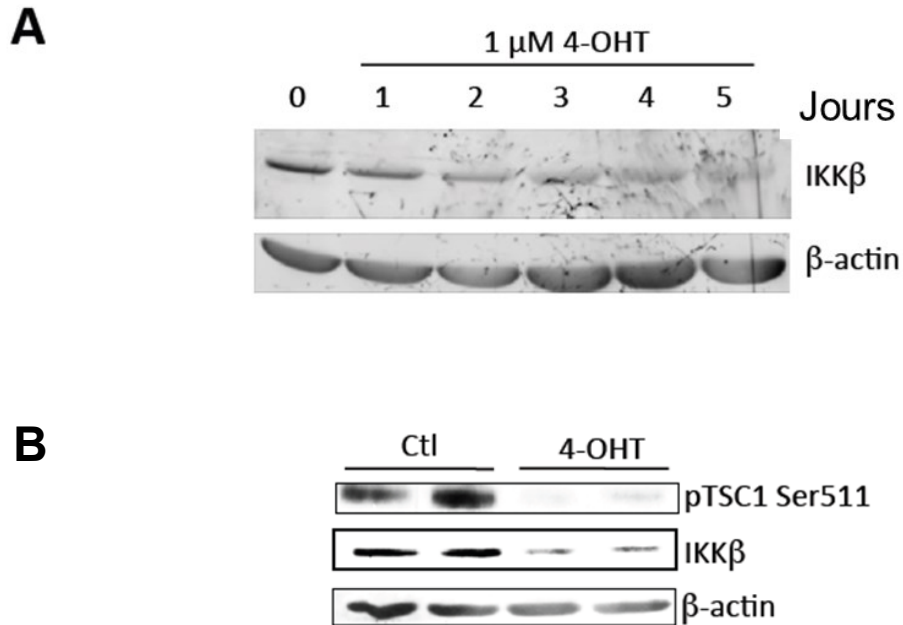
Aussi, il est connu que les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> développent des anévrismes de l'aorte abdominale. Ceux-ci sont caractérisés par un remodelage vasculaire externe de type hypotrophique qui résulte en une dilatation anormale de la paroi vasculaire en raison d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. [360] Par contre, bien que ce type d'anévrisme représente une pathologie fréquente et que leur rupture est une cause non négligeable de mort subite, les mécanismes moléculaires à l'origine de son développement sont peu définis. Or, lors de l'obtention des résultats concernant l'athérosclérose il a été observé que la suppression d'IKK $\beta$  diminue non seulement le développement de cette dernière pathologie, mais également le développement des anévrismes. (Figure. 33 A-D, 34) D'autre part, il a été observé au cours de ces mêmes expériences que l'Ang II induit également des dissections aortiques, soit des lésions au sein de la média à l'origine de la destruction des fibres élastiques et des fibres musculaires qui constituent les parois de l'aorte. Cette atteinte est sérieuse puisque 50% de décès lui sont associés si elle n'est pas prise en charge dans les 48 heures suivant sa survenue. [361] Or, en l'absence d'IKK $\beta$  dans les CML des souris *SMA-CreER*<sup>T2</sup>*IKK $\beta$* <sup>Flox/Flox</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> de telles complications n'ont pas eu lieu. (Figure. 34) Ainsi, la déficience d'IKK $\beta$  dans les CML semble bénéfique pour l'athérosclérose, mais également pour plusieurs autres types de pathologies touchant l'aorte, faisant de cette protéine une cible thérapeutique encore plus attrayante.

Des essais quantifiant l'état inflammatoire et hypertrophique des artères des souris *SMA-CreER*<sup>T2</sup>*IKK $\beta$* <sup>Flox/Flox</sup>*ApoE*<sup>-/-</sup> traitées ou non au tamoxifène et à l'Ang II restent à être réalisés afin de déterminer si la diminution du développement de l'athérosclérose lors de la suppression d'IKK $\beta$  est associée à l'inhibition des processus inflammatoires et hypertrophiques tel que démontré *in vitro*. Des expériences dans lesquelles l'athérosclérose est induite par d'autres déterminants pathologiques au niveau de ce même modèle transgénique de souris sont également planifiées dans le but de déterminer si IKK $\beta$  est effectivement un point de

convergence aux divers facteurs de risque de cette pathologie. L'un des plus grands défis concernant l'athérosclérose est d'induire sa régression. En effet, les traitements visant cette pathologie sont connus pour ralentir sa progression, mais aucun de ces derniers ne peut induire sa réversion. C'est à ce niveau que le modèle *SMA-CreER<sup>T2</sup>IKK $\beta$ <sup>Flox/Flox</sup>ApoE<sup>-/-</sup>* inductible prend tout son importance. En effet, il sera possible dans un premier temps d'induire le développement de l'athérosclérose chez les souris *SMA-CreER<sup>T2</sup>IKK $\beta$ <sup>Flox/Flox</sup>ApoE<sup>-/-</sup>* et dans un deuxième temps d'éliminer l'expression du gène d'IKK $\beta$  spécifiquement au niveau de leur CML afin de déterminer si l'absence de cette kinase est suffisante pour induire une disparition significative des plaques athéromateuses.

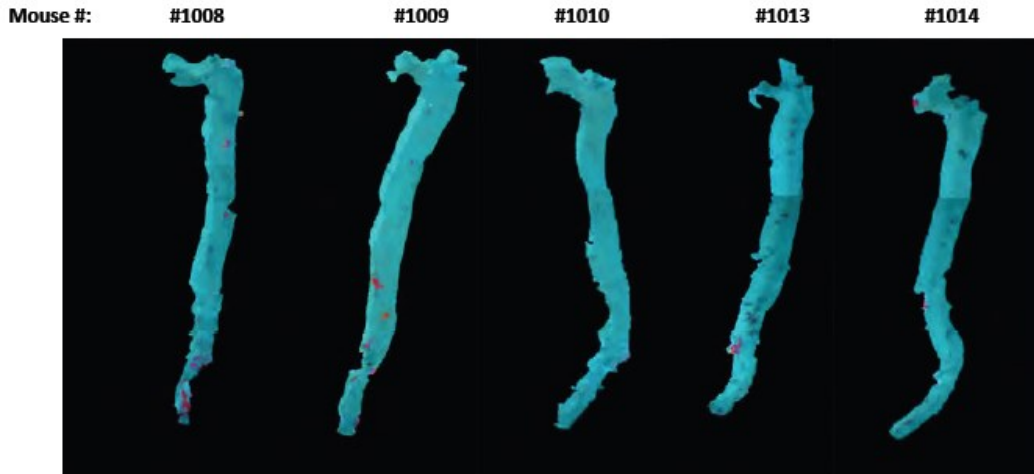
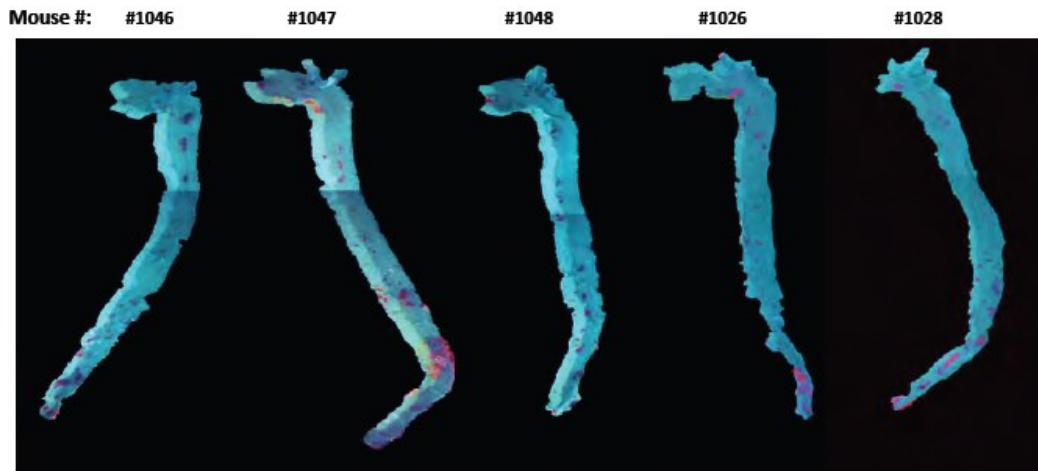


## 2.4.1 Figures résultats préliminaires



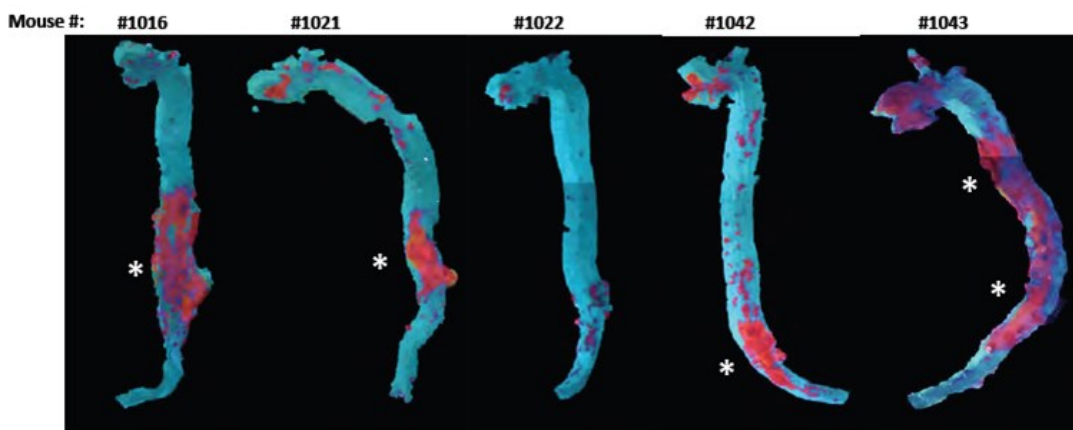
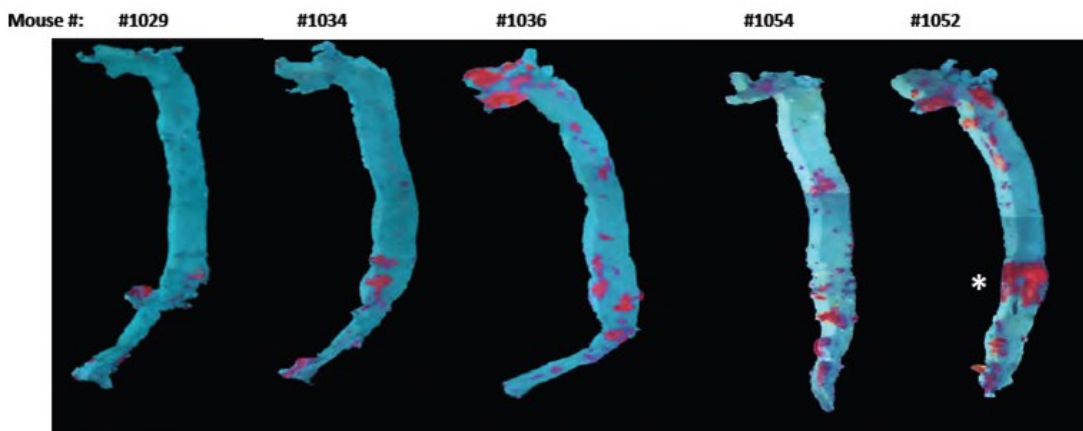
**Figure. 32 :Le traitement au tamoxifène des CMLV isolées de l'aorte des souris *SMA-CreER<sup>T2</sup>IKK $\beta$ <sup>Flox/Flox</sup>ApoE<sup>-/-</sup>* réduit l'expression d'IKK $\beta$  ainsi que la signalisation IKK $\beta$ -dépendante.**

A) Les CMLV ont été exposées à 1  $\mu$ M de 4-hydroxy-tamoxifène (4-OHT) pour les jours indiqués et l'expression d'IKK $\beta$  a été visualisée par immunobuvardage. B) Les CMLV ont été traités avec 0,5  $\mu$ M de 4-OHT pendant 4 jours, synchronisées pour 48 heures et exposées à 100 nM d'Ang II. Les extraits cellulaires ont été analysés par immunobuvardage avec les anticorps spécifiés.

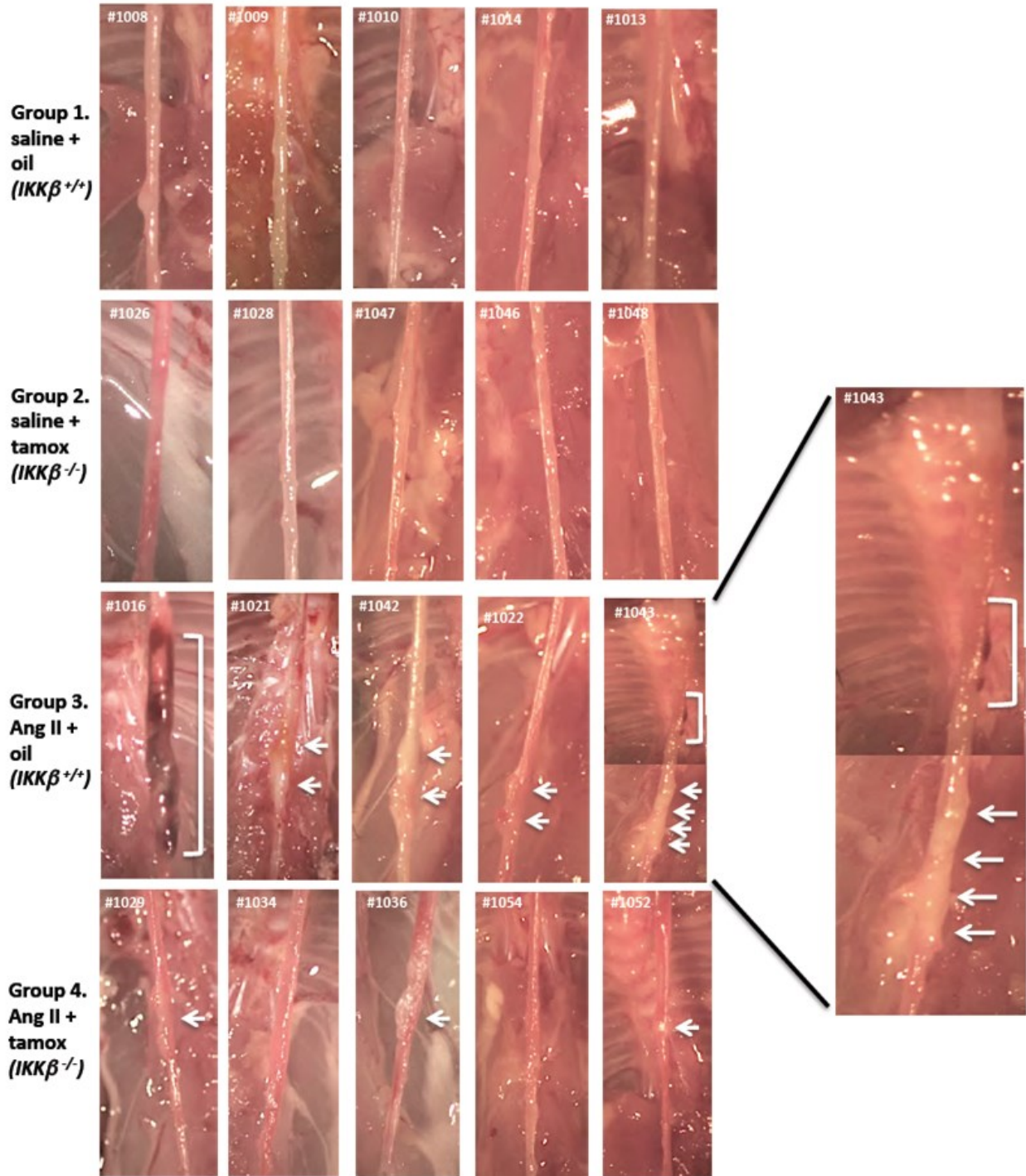
**A****Group 1. saline + oil (*IKK $\beta$ <sup>+/+</sup>*)****B****Group 2. saline + tamox (*IKK $\beta$ <sup>-/-</sup>*)**

**Figure. 33: La délétion d'IKK $\beta$  dans les CML des souris diminue les lésions athérosclérotiques induites par l'Ang II au niveau de l'aorte.**

De l'huile d'arachide ou du tamoxifène préalablement émulsionné dans l'huile d'arachide a été injecté par voie intrapéritonéale pendant 5 jours consécutifs à des souris mâles *SMA-CreER<sup>T2</sup>IKK $\beta$ <sup>Flox/Flox</sup>ApoE<sup>-/-</sup>* de 8 semaines d'âge. Deux jours suivant la dernière injection, des mini-pompes osmotiques contenant de la solution saline ou de l'Ang II ont été implantées en sous-cutané aux souris. La perfusion de solution saline ou d'Ang II (1000 ng/kg/min) s'est poursuivie pendant 28 jours. A) Coloration au Oil Red O de la crosse aortique, de l'aorte thoracique et de l'aorte abdominale de cinq souris ayant reçu de l'huile d'arachide et de la saline ou B) ayant

**C****Group 3. Ang II + oil (*IKK $\beta$ <sup>+/-</sup>*)****D****Group 4. Ang II + tamox (*IKK $\beta$ <sup>-/-</sup>*)**

reçu du tamoxifène et de la saline. Cette expérience contrôle démontre qu'en l'absence d'Ang II, l'administration de saline ainsi que la suppression d'IKK $\beta$  spécifiquement au niveau des CML n'influence pas le dépôt lipidique caractéristique du développement des lésions athérosclérotiques. C) Coloration au Oil Red O de la crosse aortique, de l'aorte thoracique et de l'aorte abdominale de cinq souris ayant reçu de l'huile d'arachide et de l'Ang II ou D) ayant reçu du tamoxifène et de l'Ang II. Cette expérience démontre que les lésions athérosclérotiques induites par l'Ang II ainsi que les lésions au niveau de l'aorte abdominale typique des anévrismes (astérisques blancs) sont diminuées en l'absence d'IKK $\beta$  au sein des CML. *Résultats générés et présentés avec l'approbation de Florence Dô.*



**Figure. 34: La délétion d'IKK $\beta$  dans les CML des souris atténue les anévrismes de l'aorte abdominale sus-rénale induits par l'Ang II.**

De l'huile d'arachide ou du tamoxifène préalablement émulsionné dans l'huile d'arachide a été injecté par voie intrapéritonéale pendant 5 jours consécutifs à des souris mâles *SMA-CreER<sup>T2</sup>IKK $\beta$ <sup>Flox/Flox</sup>ApoE<sup>-/-</sup>* de 8 semaines d'âge. Deux jours suivant la dernière injection, des mini-pompes osmotiques contenant de la solution saline ou de l'Ang II ont été implantées en sous-cutané aux souris. La perfusion de solution saline ou d'Ang II (1000 ng/kg/min) s'est poursuivie pendant 28 jours. Les souris ont par la suite été sacrifiées et les tissus conjonctifs entourant les aortes ont été retirés. Les aortes abdominales sus-rénale ont ensuite été visualisés en microscopie. Groupes 1 et 2 : La perfusion de solution saline et la délétion spécifique d'IKK $\beta$  dans les CML n'affectent pas l'intégrité de l'aorte abdominale sus-rénale. Groupe 3 : La perfusion d'Ang II induit le développement d'anévrismes de l'aorte sus-rénale (flèches) et également des dissections aortiques (encadrés). Groupe 4: la délétion spécifique d'IKK $\beta$  dans les CML atténue la gravité et le nombre d'anévrismes de l'aorte abdominale sus-rénale induits par l'Ang II et aucune dissection aortique est observée. *Résultats générés et présentés avec l'approbation de Florence Dô.*

## Chapitre 5 : Conclusion

L'Ang II participe à des fonctions physiologiques essentielles au sein de l'organisme, dont la production d'aldostérone, la production de catécholamines, la modulation de la filtration glomérulaire et la régulation de la pression artérielle. Par ailleurs, elle est également impliquée dans plusieurs processus cellulaires à l'origine d'un remodelage vasculaire résultant à des atteintes aux organes cibles, dont les infarctus du myocarde et les AVC. En effet, l'Ang II induit des réponses migratoires, inflammatoires et hypertrophiques au sein des CMLV. Les traitements prescrits à ce jour pour contrer ce remodelage pathologique ne sont pas optimums puisqu'ils ne ciblent que les facteurs de risque qui lui sont associés plutôt qu'un effecteur commun à ces derniers. La démystification des mécanismes moléculaires sous-jacents aux voies de signalisation induites par l'Ang II dans les CMLV est donc essentielle à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Nos deux études en font la preuve puisqu'en questionnant ces événements elles ont permis l'identification de nombreuses cibles. Or, l'information principale découlant de ces deux publications est que la kinase IKK $\beta$  est en amont des réponses inflammatoires et hypertrophiques dans les CMLV exposées à l'Ang II tant au niveau d'un modèle *in vitro* que d'un modèle *in vivo*.

En conjonction à nos deux études, nos résultats préliminaires démontrent qu'IKK $\beta$  occupe une fonction délétère *in vivo* au cours du développement de diverses maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose. De plus, la plupart des déterminants pathologiques à l'origine de ces pathologies converge à l'activation de cette kinase. Ainsi, l'amalgame de tous les faits présentés indique qu'IKK $\beta$  est possiblement une cible thérapeutique à préconiser lors des maladies cardiovasculaires. Dans l'éventualité que cette dernière s'avère une cible invalide, une seconde cible a été identifiée au cours d'expériences que nous avons effectuées suivant la parution de notre premier article, soit TRAF6. En effet, nous avons déterminé que cette E3 ligase en réponse à l'Ang II est en amont notamment des processus migratoires, inflammatoires et hypertrophiques des CMLV.

En somme, les deux études que j'ai publiées, ainsi que celles qui en découlent participent à l'accroissement des connaissances moléculaires régissant la cellule et sont significatives pour la recherche translationnelle.

## Références

1. Mansur SJ, Hage FG, Oparil S (2010) Have the renin-angiotensin-aldosterone system perturbations in cardiovascular disease been exhausted? *Curr Cardiol Rep* 12: 450-463.
2. Nguyen G (2006) Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 69: 1503-1506.
3. Balakumar P, Jagadeesh G (2010) Cardiovascular and renal pathologic implications of prorenin, renin, and the (pro)renin receptor: promising young players from the old renin-angiotensin-aldosterone system. *J Cardiovasc Pharmacol* 56: 570-579.
4. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86: 747-803.
5. Page IH, Helmer OM, Plentl AA, Kohlstaedt KG, Corcoran AC (1943) SUGGESTED CHANGE IN DESIGNATION OF "RENIN-ACTIVATOR" (HYPERTENSINOGEN) TO RENIN-SUBSTRATE (agr GLOBULIN). *Science* 98: 153-154.
6. Bujak-Gizycka B, Olszanecki R, Suski M, Madej J, Stachowicz A, et al. (2010) Angiotensinogen Metabolism in Rat Aorta: Robust Formation of Proangiotensin-12. *Journal of Physiology and Pharmacology* 61: 679-682.
7. Hollenberg NK (2007) Renin inhibition: what are the clinical perspectives? *Semin Nephrol* 27: 511-518.
8. Cullen-McEwen LA, Douglas-Denton RN, Bertram JF (2012) Estimating total nephron number in the adult kidney using the physical disector/fractionator combination. *Methods Mol Biol* 886: 333-350.
9. Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, et al. (2007) Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50: 103-109.
10. Schlaich MP, Sobotka PA, Krum H, Lambert E, Esler MD (2009) Renal sympathetic-nerve ablation for uncontrolled hypertension. *N Engl J Med* 361: 932-934.
11. Peti-Peterdi J, Harris RC (2010) Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol* 21: 1093-1096.
12. Bell PD, Komlosi P, Zhang ZR (2009) ATP as a mediator of macula densa cell signalling. *Purinergic Signal* 5: 461-471.
13. Harrison-Bernard LM (2009) The renal renin-angiotensin system. *Adv Physiol Educ* 33: 270-274.
14. Morales R, Watier Y, Bocskei Z (2012) Human prorenin structure sheds light on a novel mechanism of its autoinhibition and on its non-proteolytic activation by the (pro)renin receptor. *J Mol Biol* 421: 100-111.
15. Wang PH, Do YS, Macaulay L, Shinagawa T, Anderson PW, et al. (1991) Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J Biol Chem* 266: 12633-12638.
16. Amin RP, Vickers AE, Sistare F, Thompson KL, Roman RJ, et al. (2004) Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* 112: 465-479.



17. Mercure C, Jutras I, Day R, Seidah NG, Reudelhuber TL (1996) Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension* 28: 840-846.
18. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM (2011) A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides* 32: 2141-2150.
19. Silver RB, Reid AC, Mackins CJ, Askwith T, Schaefer U, et al. (2004) Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13607-13612.
20. Veerappan A, Reid AC, Estephan R, O'Connor N, Thadani-Mulero M, et al. (2008) Mast cell renin and a local renin-angiotensin system in the airway: role in bronchoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1315-1320.
21. Shorning BY, Jarde T, McCarthy A, Ashworth A, de Leng WW, et al. (2012) Intestinal renin-angiotensin system is stimulated after deletion of Lkb1. *Gut* 61: 202-213.
22. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N (2012) The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obes Rev* 13: 136-149.
23. Hollenberg NK (2002) AT(1)-receptor blockade and the kidney: importance of non-ACE pathways in health and disease. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 3: S59-63.
24. Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A (2004) Raised prorenin and renin concentrations in pre-eclamptic placentae when measured after acid activation. *Placenta* 25: 631-636.
25. Jan Danser AH, Saris JJ (2002) Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation? *J Mol Cell Cardiol* 34: 1463-1472.
26. Saris JJ, Derkx FH, De Bruin RJ, Dekkers DH, Lamers JM, et al. (2001) High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1706-1715.
27. Admiraal PJ, van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Sluiter W, et al. (1999) Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. *J Hypertens* 17: 621-629.
28. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, et al. (2002) Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109: 1417-1427.
29. Burckle CA, Jan Danser AH, Muller DN, Garrelds IM, Gasc JM, et al. (2006) Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 47: 552-556.
30. Ott C, Schneider MP, Delles C, Schlaich MP, Hilgers KF, et al. (2011) Association of (pro)renin receptor gene polymorphism with blood pressure in Caucasian men. *Pharmacogenet Genomics* 21: 347-349.
31. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, et al. (2005) Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 111: 1012-1018.
32. Skeggs LT, Jr., Kahn JR, Shumway NP (1956) The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 103: 295-299.
33. Riordan JF (2003) Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol* 4: 225.

34. Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2004) Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme. *Protein Pept Lett* 11: 423-432.
35. Golias C, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K, Batistatou A (2007) The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia* 11: 124-128.
36. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ (1970) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9: 2583-2593.
37. Cheung HS, Cushman DW (1973) Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochim Biophys Acta* 293: 451-463.
38. Guang C, Phillips RD, Jiang B, Milani F (2012) Three key proteases--angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin--within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch Cardiovasc Dis* 105: 373-385.
39. Corradi HR, Schwager SL, Nchinda AT, Sturrock ED, Acharya KR (2006) Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J Mol Biol* 357: 964-974.
40. Fuchs S, Xiao HD, Hubert C, Michaud A, Campbell DJ, et al. (2008) Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. *Hypertension* 51: 267-274.
41. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, et al. (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87: E1-9.
42. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, et al. (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275: 33238-33243.
43. Wong TP, Ho KY, Ng EK, Debnam ES, Leung PS (2012) Upregulation of ACE2-ANG-(1-7)-Mas axis in jejunal enterocytes of type 1 diabetic rats: implications for glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E669-681.
44. Riviere G (2009) [Angiotensin-converting enzyme: a protein conserved during evolution]. *J Soc Biol* 203: 281-293.
45. Zisman LS (2005) ACE and ACE2: a tale of two enzymes. *Eur Heart J* 26: 322-324.
46. Aldigier JC, Ghannad E (2002) [Exploring AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors in humans]. *Drugs* 62 Spec No 1: 11-19.
47. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA (1999) Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S23-29.
48. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC (2012) Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
49. Violin JD, Lefkowitz RJ (2007) Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 416-422.
50. Curnow KM, Pascoe L, White PC (1992) Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 6: 1113-1118.
51. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 29: 366-373.

52. Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, et al. (2007) Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* 112: 417-428.
53. Oro C, Qian H, Thomas WG (2007) Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther* 113: 210-226.
54. Vilaradaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21: 807-812.
55. Sauliere A, Bellot M, Paris H, Denis C, Finana F, et al. (2012) Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT1 receptor entity. *Nat Chem Biol* 8: 622-630.
56. Hunyady L, Catt KJ, Clark AJ, Gaborik Z (2000) Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regul Pept* 91: 29-44.
57. Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308: 512-517.
58. Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82-97.
59. Aplin M, Christensen GL, Hansen JL (2008) Pharmacologic perspectives of functional selectivity by the angiotensin II type 1 receptor. *Trends Cardiovasc Med* 18: 305-312.
60. Kurtz TW, Kajiya T (2012) Differential pharmacology and benefit/risk of azilsartan compared to other sartans. *Vasc Health Risk Manag* 8: 133-143.
61. Reudelhuber TL (2005) The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension* 46: 1261-1262.
62. Ptasinska-Wnuk D, Mucha SA, Lawnicka H, Fryczak J, Kunert-Radek J, et al. (2012) The effects of angiotensin peptides and angiotensin receptor antagonists on the cell growth and angiogenic activity of GH3 lactosomatotroph cells in vitro. *Endocrine* 42: 88-96.
63. Haulica I, Bild W, Serban DN (2005) Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6: 121-131.
64. Olivares-Reyes JA, Jayadev S, Hunyady L, Catt KJ, Smith RD (2000) Homologous and heterologous phosphorylation of the AT(2) angiotensin receptor by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 58: 1156-1161.
65. Steckelings UM, Paulis L, Namsolleck P, Unger T (2012) AT2 receptor agonists: hypertension and beyond. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21: 142-146.
66. Yatabe J, Yoneda M, Yatabe MS, Watanabe T, Felder RA, et al. (2011) Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. *Endocrinology* 152: 1582-1588.
67. Freel EM, Connell JM (2004) Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 15: 1993-2001.
68. Huang BS, Ahmad M, White RA, Marc Y, Llorens-Cortes C, et al. (2013) Inhibition of brain angiotensin III attenuates sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 97: 424-431.

69. Reaux-Le Goazigo A, Iturrioz X, Fassot C, Claperon C, Roques BP, et al. (2005) Role of angiotensin III in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 7: 128-134.
70. Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, Aguilar MI, Thomas WG, et al. (2011) Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)* 121: 297-303.
71. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, et al. (2001) Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276: 48623-48626.
72. Fyhrquist F, Saijonmaa O (2008) Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264: 224-236.
73. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, et al. (2004) The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci* 61: 2728-2737.
74. Ferreira PM, Souza Dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ (2007) Angiotensin-(3-7) pressor effect at the rostral ventrolateral medulla. *Regul Pept* 141: 168-174.
75. Xu P, Sriramula S, Lazartigues E (2011) ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R804-817.
76. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, et al. (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111: 1806-1813.
77. Patel BM, Mehta AA (2012) Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 697: 1-12.
78. Brown NJ (2013) Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 9: 459-469.
79. Weinberger MH, Roniker B, Krause SL, Weiss RJ (2002) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *Am J Hypertens* 15: 709-716.
80. Sakoda M, Ichihara A, Kurauchi-Mito A, Narita T, Kinouchi K, et al. (2010) Aliskiren inhibits intracellular angiotensin II levels without affecting (pro)renin receptor signals in human podocytes. *Am J Hypertens* 23: 575-580.
81. Kumar R, Singh VP, Baker KM (2008) The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 168-173.
82. Kumar R, Singh VP, Baker KM (2007) The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab* 18: 208-214.
83. Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, et al. (2004) Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept* 120: 5-13.
84. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, et al. (2000) Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87: 1123-1132.
85. Baker KM, Kumar R (2006) Intracellular angiotensin II induces cell proliferation independent of AT1 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C995-1001.
86. Taugner R, Hackenthal E, Helmchen U, Ganten D, Kugler P, et al. (1982) The intrarenal renin-angiotensin-system. An immunocytochemical study on the localization of renin, angiotensinogen, converting enzyme and the angiotensins in the kidney of mouse and rat. *Klin Wochenschr* 60: 1218-1222.

87. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007) The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59: 251-287.
88. Matsui T, Tamaya K, Matsumoto K, Osajima Y, Uezono K, et al. (1999) Plasma concentrations of angiotensin metabolites in young male normotensive and mild hypertensive subjects. *Hypertens Res* 22: 273-277.
89. Fisher ND, Allan DR, Gaboury CL, Hollenberg NK (1995) Intrarenal angiotensin II formation in humans. Evidence from renin inhibition. *Hypertension* 25: 935-939.
90. Sachetelli S, Liu Q, Zhang SL, Liu F, Hsieh TJ, et al. (2006) RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69: 1016-1023.
91. Carey RM, Siragy HM (2003) Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24: 261-271.
92. Kobori H, Ozawa Y, Suzaki Y, Nishiyama A (2005) Enhanced intrarenal angiotensinogen contributes to early renal injury in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 16: 2073-2080.
93. Komine N, Khang S, Wead LM, Blantz RC, Gabbai FB (2002) Effect of combining an ACE inhibitor and an angiotensin II receptor blocker on plasma and kidney tissue angiotensin II levels. *Am J Kidney Dis* 39: 159-164.
94. Serneri GG, Boddi M, Cecioni I, Vanni S, Coppo M, et al. (2001) Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circ Res* 88: 961-968.
95. van Kats JP, Danser AH, van Meegen JR, Sassen LM, Verdouw PD, et al. (1998) Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation* 98: 73-81.
96. Connelly KA, Advani A, Kim S, Advani SL, Zhang M, et al. (2011) The cardiac (pro)renin receptor is primarily expressed in myocyte transverse tubules and is increased in experimental diabetic cardiomyopathy. *J Hypertens* 29: 1175-1184.
97. Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, et al. (1991) Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem* 266: 17173-17179.
98. Healey JS, Morillo CA, Connolly SJ (2005) Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation and cardiac remodeling. *Curr Opin Cardiol* 20: 31-37.
99. Lane RE, Cowie MR, Chow AW (2005) Prediction and prevention of sudden cardiac death in heart failure. *Heart* 91: 674-680.
100. Nguyen AP, Sarmast SA, Kowal RC, Schussler JM (2010) Cardiac arrest due to torsades de pointes in a patient with complete heart block: the "R-on-T" phenomenon. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 23: 361-362.
101. Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT (1991) Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 69: 1185-1195.
102. Fisher SA (2010) Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol Genomics* 42A: 169-187.
103. Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473: 317-325.

104. Takai S, Sakaguchi M, Jin D, Yamada M, Kirimura K, et al. (2001) Different angiotensin II-forming pathways in human and rat vascular tissues. *Clin Chim Acta* 305: 191-195.
105. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM (2000) Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 101: 1653-1659.
106. Schiffrin EL, Park JB, Pu Q (2002) Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens* 20: 71-78.
107. Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, et al. (1996) Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest* 98: 1966-1970.
108. (1998) Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells; Pueyo ME, Arnal J-F, Rami J, Michel J-B, editors. C214-C220 p.
109. Watanabe T, Barker TA, Berk BC (2005) Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension* 45: 163-169.
110. Li JM, Shah AM (2003) Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* 278: 12094-12100.
111. Garrido AM, Griendling KK (2009) NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 302: 148-158.
112. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424.
113. Paravicini TM, Touyz RM (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2: S170-180.
114. Gibbons GH, Dzau VJ (1994) The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330: 1431-1438.
115. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C (2000) Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102: 1186-1191.
116. Rizzoni D, Rosei EA (2009) Small artery remodeling in diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 587-592.
117. Riccioni G (2009) Statins and carotid intima-media thickness reduction: an up-to-date review. *Curr Med Chem* 16: 1799-1805.
118. Mulvany MJ (1999) Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* 41: 9-13.
119. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM (2001) Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 38: 297-306.
120. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA (2003) Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 139: 761-776.
121. Dabiri Askari A, Feihl F, Waeber B (2009) [Arterial hypertension: macrocirculation and microcirculation]. *Rev Med Suisse* 5: 1778-1780, 1782.
122. Mortimer PS, Levick JR (2004) Chronic peripheral oedema: the critical role of the lymphatic system. *Clin Med* 4: 448-453.

123. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, Mulvany MJ (1993) Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension* 22: 523-526.
124. Intengan HD, Schiffrin EL (2001) Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38: 581-587.
125. Intengan HD, Schiffrin EL (2000) Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36: 312-318.
126. Schiffrin EL, Touyz RM (2004) From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H435-446.
127. Anwar MA, Shalhoub J, Lim CS, Gohel MS, Davies AH (2012) The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *J Vasc Res* 49: 463-478.
128. Boutouyrie P, Bussy C, Lacolley P, Girerd X, Laloux B, et al. (1999) Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling. *Circulation* 100: 1387-1393.
129. Mitchell GF (2008) Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J Appl Physiol* (1985) 105: 1652-1660.
130. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, et al. (2012) Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 125: 2520-2544.
131. Shatanawi A, Romero MJ, Iddings JA, Chandra S, Umaphathy NS, et al. (2011) Angiotensin II-induced vascular endothelial dysfunction through RhoA/Rho kinase/p38 mitogen-activated protein kinase/arginase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C1181-1192.
132. Li JM, Cui TX, Shiuchi T, Liu HW, Min LJ, et al. (2004) Nicotine enhances angiotensin II-induced mitogenic response in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 80-84.
133. Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H, Shen L, et al. (1998) Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1433-1439.
134. du Toit EF, Nabben M, Lochner A (2005) A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 100: 346-354.
135. Gurantz D, Cowling RT, Villarreal FJ, Greenberg BH (1999) Tumor necrosis factor- $\alpha$  upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts. *Circ Res* 85: 272-279.
136. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115: 1285-1295.
137. Montezano AC, Touyz RM (2012) Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110: 87-94.

138. Chiu JJ, Chien S (2011) Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91: 327-387.
139. Sanz J, Fayad ZA (2008) Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451: 953-957.
140. De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, et al. (2005) Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2106-2113.
141. Tabas I (2011) Pulling down the plug on atherosclerosis: finding the culprit in your heart. *Nat Med* 17: 791-793.
142. Zhang F, Hu Y, Xu Q, Ye S (2010) Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS One* 5: e12323.
143. Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC (2007) Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1722-1728.
144. Caplice NM, Doyle B (2005) Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells Dev* 14: 122-139.
145. Louis SF, Zahradka P (2010) Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 15: e75-85.
146. Hunter T (2007) The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 28: 730-738.
147. Shibuta T, Honda E, Shiotsu H, Tanaka Y, Vellasamy S, et al. (2013) Imatinib induces demethylation of miR-203 gene: An epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib. *Leuk Res* 37: 1278-1286.
148. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
149. Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, et al. (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17: 675-689.
150. Swulius MT, Waxham MN (2008) Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci* 65: 2637-2657.
151. Biondi RM, Nebreda AR (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* 372: 1-13.
152. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26: 3279-3290.
153. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, et al. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183.
154. Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 9-22.
155. Tibes R, Trent J, Kurzrock R (2005) Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 357-384.



156. (2002) Meeting the challenges of a changing profession. *Tenn Nurse* 65: 10-17.
157. Johnson LN, Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* 101: 2209-2242.
158. Hubbard MJ, Cohen P (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18: 172-177.
159. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7: 591-600.
160. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* 125: 531-537.
161. Kimura Y, Tanaka K (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 147: 793-798.
162. Pickart CM, Eddins MJ (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695: 55-72.
163. Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K, Singh RK, Wollscheid HP, et al. (2007) UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem* 282: 23010-23014.
164. Komander D (2009) The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 37: 937-953.
165. Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
166. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, et al. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5: 461-466.
167. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1783-1786.
168. Wilk S, Orłowski M (1980) Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem* 35: 1172-1182.
169. Xu Q, Farah M, Webster JM, Wojcikiewicz RJ (2004) Bortezomib rapidly suppresses ubiquitin thioesterification to ubiquitin-conjugating enzymes and inhibits ubiquitination of histones and type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Mol Cancer Ther* 3: 1263-1269.
170. Hofmann RM, Pickart CM (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96: 645-653.
171. Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ (2009) Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 659-671.
172. Hurley JH, Lee S, Prag G (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399: 361-372.
173. Takami Y, Nakagami H, Morishita R, Katsuya T, Hayashi H, et al. (2008) Potential role of CYLD (Cylindromatosis) as a deubiquitinating enzyme in vascular cells. *Am J Pathol* 172: 818-829.
174. Xia ZP, Sun L, Chen X, Pineda G, Jiang X, et al. (2009) Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461: 114-119.

175. Braten O, Shabek N, Kravtsova-Ivantsiv Y, Ciechanover A (2012) Generation of free ubiquitin chains is up-regulated in stress and facilitated by the HECT domain ubiquitin ligases UFD4 and HUL5. *Biochem J* 444: 611-617.
176. Lydeard JR, Harper JW (2010) Inhibitors for E3 ubiquitin ligases. *Nat Biotechnol* 28: 682-684.
177. Goldenberg SJ, Marblestone JG, Mattern MR, Nicholson B (2010) Strategies for the identification of ubiquitin ligase inhibitors. *Biochem Soc Trans* 38: 132-136.
178. Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT, Mirshahidi HR (2011) Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* 4: 16.
179. Tedgui A, Mallat Z (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86: 515-581.
180. Doyon P, Servant MJ (2010) Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal S6 kinase intracellular pathways link the angiotensin II AT1 receptor to the phosphorylation and activation of the I $\kappa$ B kinase complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 285: 30708-30718.
181. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, et al. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science* 278: 860-866.
182. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, et al. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 93: 1231-1240.
183. Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF- $\kappa$ B activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000158.
184. Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C (2003) Tetrameric oligomerization of I $\kappa$ B kinase gamma (IKK $\gamma$ ) is obligatory for IKK complex activity and NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 23: 2029-2041.
185. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M (2006) Dissection of the NF- $\kappa$ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* 13: 861-872.
186. Catley MC, Chivers JE, Holden NS, Barnes PJ, Newton R (2005) Validation of IKK beta as therapeutic target in airway inflammatory disease by adenoviral-mediated delivery of dominant-negative IKK beta to pulmonary epithelial cells. *Br J Pharmacol* 145: 114-122.
187. Ruocco MG, Maeda S, Park JM, Lawrence T, Hsu LC, et al. (2005) I $\kappa$ B kinase (IKK) $\beta$ , but not IKK $\alpha$ , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 201: 1677-1687.
188. Park SH, Sui Y, Gizard F, Xu J, Rios-Pilier J, et al. (2012) Myeloid-specific I $\kappa$ B kinase beta deficiency decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2869-2876.
189. Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-716.
190. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM (2012) IKK biology. *Immunol Rev* 246: 239-253.
191. Schmid JA, Birbach A (2008) I $\kappa$ B kinase beta (IKK $\beta$ /IKK2/I $\kappa$ BK $\beta$ )--a key molecule in signaling to the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 157-165.

192. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 12: 695-708.
193. Douillette A, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Chenard V, et al. (2006) The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem* 281: 13275-13284.
194. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, et al. (1996) Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97: 1715-1722.
195. Monaco C, Paleolog E (2004) Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Res* 61: 671-682.
196. Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T (1999) Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274: 10641-10648.
197. Zhao Q, Lee FS (1999) Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 274: 8355-8358.
198. Chen ZJ (2012) Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev* 246: 95-106.
199. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, et al. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270: 2008-2011.
200. Keshet Y, Seger R (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661: 3-38.
201. Dai L, Aye Thu C, Liu XY, Xi J, Cheung PC (2012) TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB Life* 64: 825-834.
202. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, et al. (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5: 649-658.
203. Sakurai H (2012) Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 33: 522-530.
204. Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, et al. (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15: 535-548.
205. Omori E, Inagaki M, Mishina Y, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J (2012) Epithelial transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) is activated through two independent mechanisms and regulates reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3365-3370.
206. Ma FY, Tesch GH, Ozols E, Xie M, Schneider MD, et al. (2011) TGF-beta1-activated kinase-1 regulates inflammation and fibrosis in the obstructed kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1410-1421.
207. Zhao YG, Wang Y, Hao W, Wan YY (2011) An essential role for TAK1 in the contact hypersensitivity response. *Cell Mol Immunol* 8: 315-324.
208. Nishimoto S, Nishida E (2006) MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7: 782-786.

209. Sun W, Li H, Yu Y, Fan Y, Grabiner BC, et al. (2009) MEKK3 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal* 21: 1488-1494.
210. Yang J, Lin Y, Guo Z, Cheng J, Huang J, et al. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2: 620-624.
211. Matitau AE, Gabor TV, Gill RM, Scheid MP (2013) MEKK2 Kinase Association with 14-3-3 Protein Regulates Activation of c-Jun N-terminal Kinase. *J Biol Chem* 288: 28293-28302.
212. Di Y, Li S, Wang L, Zhang Y, Dorf ME (2008) Homeostatic interactions between MEKK3 and TAK1 involved in NF-kappaB signaling. *Cell Signal* 20: 705-713.
213. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22: 245-257.
214. Sun W, Yu Y, Dotti G, Shen T, Tan X, et al. (2009) PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha-induced IKKbeta-NF-kappaB activation. *Cell Signal* 21: 95-102.
215. Witt J, Barisic S, Schumann E, Allgower F, Sawodny O, et al. (2009) Mechanism of PP2A-mediated IKK beta dephosphorylation: a systems biological approach. *BMC Syst Biol* 3: 71.
216. Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, et al. (2006) Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 281: 39891-39896.
217. Sun W, Wang H, Zhao X, Yu Y, Fan Y, et al. (2010) Protein phosphatase 2A acts as a mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MEKK3) phosphatase to inhibit lysophosphatidic acid-induced IkappaB kinase beta/nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 285: 21341-21348.
218. Sun W, Yang J (2010) Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal* 22: 1799-1803.
219. Bibeau-Poirier A, Servant MJ (2008) Roles of ubiquitination in pattern-recognition receptors and type I interferon receptor signaling. *Cytokine* 43: 359-367.
220. Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, et al. (2000) A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 101: 777-787.
221. Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20: 6482-6491.
222. Bhoj VG, Chen ZJ (2009) Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458: 430-437.
223. Au PY, Yeh WC (2007) Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol* 597: 32-47.
224. Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7: 758-765.
225. Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H (2002) All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115: 679-688.
226. Sun SC (2010) CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes. *Cell Death Differ* 17: 25-34.

227. Amerik AY, Hochstrasser M (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695: 189-207.
228. Ma A, Malynn BA (2012) A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat Rev Immunol* 12: 774-785.
229. Tracey KJ, Cerami A (1994) Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45: 491-503.
230. Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635.
231. Darding M, Meier P (2012) IAPs: guardians of RIPK1. *Cell Death Differ* 19: 58-66.
232. Tada K, Okazaki T, Sakon S, Koburai T, Kurosawa K, et al. (2001) Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276: 36530-36534.
233. Vince JE, Pantaki D, Feltham R, Mace PD, Cordier SM, et al. (2009) TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf- $\kappa$ b and to prevent tnf-induced apoptosis. *J Biol Chem* 284: 35906-35915.
234. Iwai K (2014) Diverse roles of the ubiquitin system in NF-kappaB activation. *Biochim Biophys Acta* 1843: 129-136.
235. Beug ST, Cheung HH, LaCasse EC, Korneluk RG (2012) Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends Immunol* 33: 535-545.
236. Bianchi K, Meier P (2009) A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol Cell* 36: 736-742.
237. Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B, Schmukle AC, Cordier SM, et al. (2009) Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* 36: 831-844.
238. Wagner S, Carpentier I, Rogov V, Kreike M, Ikeda F, et al. (2008) Ubiquitin binding mediates the NF-kappaB inhibitory potential of ABIN proteins. *Oncogene* 27: 3739-3745.
239. Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, Akutsu M, Suzuki N, et al. (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* 136: 1098-1109.
240. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T (2008) Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 79: 360-376.
241. Choi KW, Park HJ, Jung DH, Kim TW, Park YM, et al. (2010) Inhibition of TNF-alpha-induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF-kappaB signaling pathways. *Vascul Pharmacol* 53: 273-280.
242. Chen YM, Chiang WC, Lin SL, Wu KD, Tsai TJ, et al. (2004) Dual regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth muscle cells by nuclear factor-kappaB and activator protein-1: modulation by type III phosphodiesterase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 978-986.
243. Wang Z, Castresana MR, Newman WH (2001) NF-kappaB is required for TNF-alpha-directed smooth muscle cell migration. *FEBS Lett* 508: 360-364.

244. Lee B, Moon SK (2005) Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J Nutr* 135: 2767-2773.
245. Newby AC (2008) Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 2108-2114.
246. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R (2010) TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther* 127: 295-314.
247. Tam LS, Kitas GD, Gonzalez-Gay MA (2014) Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis? *Rheumatology (Oxford)*.
248. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, et al. (2006) Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 295: 2275-2285.
249. Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, Molnar EE, Choi Y (2008) TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One* 3: e4064.
250. Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, et al. (2001) Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21: 2475-2484.
251. Clark K, Nanda S, Cohen P (2013) Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 673-685.
252. Emmerich CH, Ordureau A, Strickson S, Arthur JS, Pedrioli PG, et al. (2013) Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15247-15252.
253. Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis SE, et al. (1996) Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1000-1006.
254. Qamar A, Rader DJ (2012) Effect of interleukin 1beta inhibition in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 23: 548-553.
255. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G (2010) IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6: 232-241.
256. von der Thusen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA (2003) Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 55: 133-166.
257. Dayer JM (2002) Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis? *J Rheumatol Suppl* 65: 10-15.
258. Kalliolias GD, Liossis SN (2008) The future of the IL-1 receptor antagonist anakinra: from rheumatoid arthritis to adult-onset Still's disease and systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 349-359.
259. Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, Yang Z, Lee JK, et al. (2012) Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 122: 70-79.

260. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, et al. (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 157-186.
261. Sun J, Lin X (2008) Beta-arrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17085-17090.
262. Grabiner BC, Blonska M, Lin PC, You Y, Wang D, et al. (2007) CARMA3 deficiency abrogates G protein-coupled receptor-induced NF- $\kappa$ B activation. *Genes Dev* 21: 984-996.
263. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, et al. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6931-6936.
264. Schober A, Siess W (2012) Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol* 167: 465-482.
265. Chen SU, Chou CH, Chao KH, Lee H, Lin CW, et al. (2010) Lysophosphatidic acid up-regulates expression of growth-regulated oncogene-alpha, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in human first-trimester trophoblasts: possible roles in angiogenesis and immune regulation. *Endocrinology* 151: 369-379.
266. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, et al. (2007) IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130: 440-455.
267. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 49-62.
268. Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293.
269. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, et al. (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39: 171-183.
270. Diab S, Kumarasiri M, Yu M, Teo T, Proud C, et al. MAP Kinase-Interacting Kinases—Emerging Targets against Cancer. *Chemistry & Biology*.
271. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 441: 1-21.
272. Thomas G (2002) The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biol Res* 35: 305-313.
273. Tarantino G, Capone D (2013) Inhibition of the mTOR pathway: a possible protective role in coronary artery disease. *Ann Med* 45: 348-356.
274. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 321-329.
275. Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJ, et al. (2008) Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab* 8: 372-383.
276. Brasier AR, Recinos A, 3rd, Eledrisi MS (2002) Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1257-1266.

277. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, et al. (2000) Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 86: 1266-1272.
278. Li XC, Zhuo JL (2008) Nuclear factor-kappaB as a hormonal intracellular signaling molecule: focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17: 37-43.
279. Habelhah H (2010) Emerging complexity of protein ubiquitination in the NF-kappaB pathway. *Genes Cancer* 1: 735-747.
280. Jamaluddin M, Meng T, Sun J, Boldogh I, Han Y, et al. (2000) Angiotensin II induces nuclear factor (NF)-kappaB1 isoforms to bind the angiotensinogen gene acute-phase response element: a stimulus-specific pathway for NF-kappaB activation. *Mol Endocrinol* 14: 99-113.
281. Kalra D, Sivasubramanian N, Mann DL (2002) Angiotensin II induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation* 105: 2198-2205.
282. Shinohara H, Yasuda T, Aiba Y, Sanjo H, Hamadate M, et al. (2005) PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J Exp Med* 202: 1423-1431.
283. Wang D, You Y, Case SM, McAllister-Lucas LM, Wang L, et al. (2002) A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 3: 830-835.
284. Doyon P, van Zuylen WJ, Servant MJ (2013) Role of IkappaB Kinase-beta in the Growth-Promoting Effects of Angiotensin II In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2850-2857.
285. Tabas I, Glass CK (2013) Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 339: 166-172.
286. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
287. Feldmann M (2002) Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2: 364-371.
288. Lucas AD, Greaves DR (2001) Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* 3: 1-18.
289. Emmerich J (1998) *Maladies des vaisseaux: Doin*.
290. Berg T (2008) Inhibition of transcription factors with small organic molecules. *Curr Opin Chem Biol* 12: 464-471.
291. Shoelson SE, Lee J, Yuan M (2003) Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S49-52.
292. Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, et al. (2005) Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem* 280: 21763-21772.
293. McAllister-Lucas LM, Ruland J, Siu K, Jin X, Gu S, et al. (2007) CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 139-144.



294. Wu L, Iwai M, Li Z, Li JM, Mogi M, et al. (2006) Nifedipine inhibited angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression: involvement of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase and nuclear factor kappa B-inducing kinase. *J Hypertens* 24: 123-130.
295. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G (2005) Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity. *Handb Exp Pharmacol*: 645-663.
296. Li S, Fan YS, Chow LH, Van Den Diepstraten C, van Der Veer E, et al. (2001) Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circ Res* 89: 517-525.
297. Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Varela O, Badimon L (2001) Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products. *Eur J Clin Invest* 31: 939-949.
298. Dzau VJ (2001) Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 37: 1047-1052.
299. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26: 3214-3226.
300. Chen J, Chen ZJ (2013) Regulation of NF-kappaB by ubiquitination. *Curr Opin Immunol* 25: 4-12.
301. Churchill E, Budas G, Vallentin A, Koyanagi T, Mochly-Rosen D (2008) PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 569-599.
302. Zirlik A, Bavendiek U, Libby P, MacFarlane L, Gerdes N, et al. (2007) TRAF-1, -2, -3, -5, and -6 are induced in atherosclerotic plaques and differentially mediate proinflammatory functions of CD40L in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1101-1107.
303. Weinberg EO, Genco CA (2012) Directing TRAF-ic: cell-specific TRAF6 signaling in chronic inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 126: 1678-1680.
304. Polykratis A, van Loo G, Xanthoulea S, Hellmich M, Pasparakis M (2012) Conditional targeting of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 reveals opposing functions of Toll-like receptor signaling in endothelial and myeloid cells in a mouse model of atherosclerosis. *Circulation* 126: 1739-1751.
305. White BJ, Tarabishy S, Venna VR, Manwani B, Benashski S, et al. (2012) Protection from cerebral ischemia by inhibition of TGFbeta-activated kinase. *Exp Neurol* 237: 238-245.
306. Lockman JW, Reeder MD, Robinson R, Ormonde PA, Cimborra DM, et al. (2011) Oxindole derivatives as inhibitors of TAK1 kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 1724-1727.
307. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF (2010) MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13450-13455.
308. Parsons BD, Schindler A, Evans DH, Foley E (2009) A direct phenotypic comparison of siRNA pools and multiple individual duplexes in a functional assay. *PLoS One* 4: e8471.

309. Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, et al. (2007) BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* 401: 29-38.
310. Zhang L, Cheng J, Ma Y, Thomas W, Zhang J, et al. (2005) Dual pathways for nuclear factor kappaB activation by angiotensin II in vascular smooth muscle: phosphorylation of p65 by IkappaB kinase and ribosomal kinase. *Circ Res* 97: 975-982.
311. Panta GR, Kaur S, Cavin LG, Cortes ML, Mercurio F, et al. (2004) ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* 24: 1823-1835.
312. Polley S, Huang DB, Hauenstein AV, Fusco AJ, Zhong X, et al. (2013) A structural basis for IkappaB kinase 2 activation via oligomerization-dependent trans auto-phosphorylation. *PLoS Biol* 11: e1001581.
313. Fremin C, Meloche S (2010) From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 3: 8.
314. Akinleye A, Furqan M, Mukhi N, Ravella P, Liu D (2013) MEK and the inhibitors: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 6: 27.
315. Nakamura T, Colbert M, Krenz M, Molkentin JD, Hahn HS, et al. (2007) Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. *J Clin Invest* 117: 2123-2132.
316. Bueno OF, Molkentin JD (2002) Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res* 91: 776-781.
317. Hu Y, Dietrich H, Metzler B, Wick G, Xu Q (2000) Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 18-26.
318. Giasson E, Meloche S (1995) Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270: 5225-5231.
319. Le NT, Heo KS, Takei Y, Lee H, Woo CH, et al. (2013) A crucial role for p90RSK-mediated reduction of ERK5 transcriptional activity in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circulation* 127: 486-499.
320. Delgado Roche L, Hern A, #xe1, ndez D (2012) New Alternatives for Atherosclerosis Treatment Based on Immunomodulation. *ISRN Vascular Medicine* 2012: 6.
321. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, et al. (2008) Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 358: 1547-1559.
322. Wang M, Thanou M (2010) Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res* 62: 90-99.
323. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2: 329-333.
324. Nagai K, Shibata S, Akishita M, Sudoh N, Obara T, et al. (2013) Efficacy of combined use of three non-invasive atherosclerosis tests to predict vascular events in the elderly; carotid intima-media thickness, flow-mediated dilation of brachial artery and pulse wave velocity. *Atherosclerosis* 231: 365-370.
325. Owens GK (1989) Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 257: H1755-1765.

326. Owens GK (1987) Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 9: 178-187.
327. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK (1988) Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62: 749-756.
328. Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S (2000) Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148: 543-556.
329. Govindarajan G, Eble DM, Lucchesi PA, Samarel AM (2000) Focal adhesion kinase is involved in angiotensin II-mediated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 87: 710-716.
330. Rocic P, Govindarajan G, Sabri A, Lucchesi PA (2001) A role for PYK2 in regulation of ERK1/2 MAP kinases and PI 3-kinase by ANG II in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C90-99.
331. Hafizi S, Wang X, Chester AH, Yacoub MH, Proud CG (2004) ANG II activates effectors of mTOR via PI3-K signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1232-1238.
332. Ishida M, Ishida T, Nakashima H, Miho N, Miyagawa K, et al. (2003) Mnk1 is required for angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 93: 1218-1224.
333. Lv P, Miao SB, Shu YN, Dong LH, Liu G, et al. (2012) Phosphorylation of smooth muscle 22alpha facilitates angiotensin II-induced ROS production via activation of the PKCdelta-P47phox axis through release of PKCdelta and actin dynamics and is associated with hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Circ Res* 111: 697-707.
334. Glickman JF (2004) Assay Development for Protein Kinase Enzymes.
335. Nagashima K, Sasseville VG, Wen D, Bielecki A, Yang H, et al. (2006) Rapid TNFR1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of IKKbeta. *Blood* 107: 4266-4273.
336. Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, et al. (2010) mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem* 285: 7866-7879.
337. Storz P, Toker A (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J* 22: 109-120.
338. Bijli KM, Fazal F, Rahman A (2012) Regulation of Rela/p65 and endothelial cell inflammation by proline-rich tyrosine kinase 2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47: 660-668.
339. Lundberg MS, Ramos KS, Chilian WM (1996) Differential response of rat aortic and coronary smooth muscle cell DNA synthesis in response to mechanical stretch in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 13-15.
340. Nabzdyk CS, Chun M, Pradhan Nabzdyk L, Yoshida S, LoGerfo FW (2012) Differential susceptibility of human primary aortic and coronary artery vascular cells to RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 261-265.

341. Dan HC, Baldwin AS (2008) Differential involvement of I $\kappa$ B kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt. *J Immunol* 180: 7582-7589.
342. Servant MJ, Giasson E, Meloche S (1996) Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 16047-16052.
343. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL (1999) Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation* 100: 2267-2275.
344. Martinez-Lemus LA, Galinanes EL (2011) Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov Today Dis Models* 8: 21-28.
345. Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, Hartigan PM, Maron DJ, et al. (2007) Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *N Engl J Med* 356: 1503-1516.
346. Costa MA, Simon DI (2005) Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation* 111: 2257-2273.
347. Mueller MA, Beutner F, Teupser D, Ceglarek U, Thiery J (2008) Prevention of atherosclerosis by the mTOR inhibitor everolimus in LDLR<sup>-/-</sup> mice despite severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 198: 39-48.
348. Martinet W, Verheye S, De Meyer I, Timmermans JP, Schrijvers DM, et al. (2012) Everolimus triggers cytokine release by macrophages: rationale for stents eluting everolimus and a glucocorticoid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 1228-1235.
349. Wang X, Phillips MI, Mehta JL (2011) LOX-1 and angiotensin receptors, and their interplay. *Cardiovasc Drugs Ther* 25: 401-417.
350. Leung AA, Southern DA, Galbraith PD, Knudtson ML, Philpott AC, et al. (2013) Time Dependency of Outcomes for Drug-Eluting vs Bare-Metal Stents. *Can J Cardiol* 29: 1616-1622.
351. Daemen J, Tanimoto S, Garcia-Garcia HM, Kukreja N, van de Sande M, et al. (2007) Comparison of three-year clinical outcome of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents versus bare metal stents in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (from the RESEARCH and T-SEARCH Registries). *Am J Cardiol* 99: 1027-1032.
352. Luscher TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, et al. (2007) Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 115: 1051-1058.
353. Nie XM, Su LX, Xu RX, Guo YL, Zhou YJ, et al. (2013) Kruppel-like factor 2 might mediate the rapamycin-induced arterial thrombosis in vivo: implications for stent thrombosis in patients. *Chin Med J (Engl)* 126: 2636-2640.
354. Couty S, Westwood IM, Kalusa A, Cano C, Travers J, et al. (2013) The discovery of potent ribosomal S6 kinase inhibitors by high-throughput screening and structure-guided drug design. *Oncotarget* 4: 1647-1661.
355. Jaroch S (2013) *Anti-Inflammatory Drug Discovery*. Edited by Jeremy I. Levin and Stefan Laufer. *ChemMedChem* 8: 528-529.

356. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, Hsu LC, Goode J, et al. (2007) NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 130: 918-931.
357. Perkins ND (2000) The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 25: 434-440.
358. Zuckerman JE, Davis ME (2013) Targeting therapeutics to the glomerulus with nanoparticles. *Adv Chronic Kidney Dis* 20: 500-507.
359. Haase R, Magnusson T, Su B, Kopp F, Wagner E, et al. (2013) Generation of a tumor- and tissue-specific episomal non-viral vector system. *BMC Biotechnol* 13: 49.
360. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA (2000) Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 105: 1605-1612.
361. Erbel R, Alfonso F, Boileau C, Dirsch O, Eber B, et al. (2001) Diagnosis and management of aortic dissection. *Eur Heart J* 22: 1642-1681.

## **Annexe 1**

## 1.0 Article premier auteur supplémentaire

Cet article n'a pas été inclus dans le corps de l'ouvrage de cette thèse afin d'éviter de distraire le lecteur dans sa saisie de la structure logique des idées puisque l'étude qui y est présentée est complètement distincte.

### 1.1 PLoS Pathogens.

**Journal:** PLoS Pathogens.

**Article accepté**

**Parution:** 5 juillet 2012

**Facteur d'impact 2012:** 8.136

**Titre:** Proteomic profiling of the TRAF3 interactome network reveals a new role for the ER-to-Golgi transport compartments in innate immunity. PLoS Pathog **8**(7): e1002747.

**Auteur:** Wendy J van Zuylen\*, **Priscilla Doyon\***, Jean-François Clément\*, Kashif Aziz Khan, Lisa M D'Ambrosio, Florence Dô, Myriam St-Amant-Verret, Tasheen Wissanji, Gregory Emery, Anne-Claude Gingras, Sylvain Meloche and Marc J Servant

\* Ces auteurs ont contribué également à l'apport du travail.

**Cet article a été présenté dans la thèse du Dr. Jean-François Clément et tous les auteurs impliqués ont donné leur accord pour que cette étude soit abordée.**

**Directeur de recherche:** Marc J. Servant

**Apport:** Contribution à l'optimisation des protocoles, à la résolution des problèmes, à la rédaction et à l'analyse des résultats. Obtention de résultats non publiés afin de mieux caractériser le modèle proposé.

Résultats : Figures. 3B, 5A-B, 6B-C, 9A-D et Figure supplémentaire. S7A-F

# **Proteomic Profiling of the TRAF3 Interactome Network Reveals a New Role for the ER-to-Golgi Transport Compartments in Innate Immunity**

Wendy J van Zuylen<sup>1\*\*</sup>, Priscilla Doyon<sup>1\*\*</sup>, Jean-François Clément<sup>1\*\*</sup>, Kashif Aziz Khan<sup>1</sup>, Lisa  
M D'Ambrosio<sup>5</sup>, Florence Dô<sup>1</sup>, Myriam St-Amant-Verret<sup>1</sup>, Tasheen Wissanji<sup>1</sup>, Gregory  
Emery<sup>2,4</sup>, Anne-Claude Gingras<sup>5</sup>, Sylvain Meloche<sup>2,3</sup> and Marc J Servant<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup>Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, <sup>3</sup>Departments  
of Pharmacology and Molecular Biology, <sup>4</sup>Department of Pathology and Cell Biology,  
Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada; <sup>5</sup>Samuel Lunenfeld Research Institute at  
Mount Sinai Hospital, Toronto, ON; Department of Molecular Genetics, University of Toronto,  
Toronto, ON.

\*Corresponding author. Mailing Address: Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P.  
6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, Tel. 514 343-7966; Fax.  
514 343-7073

\*\* These authors have contributed equally to the work

Running title: Protein secretion system meets innate immunity

Key Words: ERGIC/Golgi/Innate immunity/TRAF3/Type I Interferon



## **ABSTRACT**

Tumor Necrosis Factor receptor-associated factor-3 (TRAF3) is a central mediator important for inducing type I interferon (IFN) production in response to intracellular double-stranded RNA (dsRNA). Here, we report the identification of Sec16A and p115, two proteins of the ER-to-Golgi vesicular transport system, as novel components of the TRAF3 interactome network. Notably, in non-infected cells, TRAF3 was found associated with markers of the ER-Exit-Sites (ERES), ER-to-Golgi intermediate compartment (ERGIC) and the cis-Golgi apparatus. Upon dsRNA and dsDNA sensing however, the Golgi apparatus fragmented into cytoplasmic punctated structures containing TRAF3 allowing its colocalization and interaction with Mitochondrial AntiViral Signaling (MAVS), the essential mitochondria-bound RIG-I-like Helicase (RLH) adaptor. In contrast, retention of TRAF3 at the ER-to-Golgi vesicular transport system blunted the ability of TRAF3 to interact with MAVS upon viral infection and consequently decreased type I IFN response. Moreover, depletion of Sec16A and p115 led to a drastic disorganization of the Golgi paralleled by the relocalization of TRAF3, which under these conditions was unable to associate with MAVS. Consequently, upon dsRNA and dsDNA sensing, ablation of Sec16A and p115 was found to inhibit IRF3 activation and anti-viral gene expression. Reciprocally, mild overexpression of Sec16A or p115 in Hec1B cells increased the activation of IFN $\beta$ , ISG56 and NF- $\kappa$ B -dependent promoters following viral infection and ectopic expression of MAVS and Tank-binding kinase-1 (TBK1). In line with these results, TRAF3 was found enriched in immunocomplexes composed of p115, Sec16A and TBK1 upon infection. Hence, we propose a model where dsDNA and dsRNA sensing induces the formation of membrane-bound compartments originating from the Golgi, which mediate the dynamic association of TRAF3 with MAVS leading to an optimal induction of innate immune responses.

## **AUTHOR SUMMARY**

In response to pathogens, such as viruses and bacteria, infected cells defend themselves by generating a set of cytokines called type I interferon (IFN). Since Type I IFN (namely IFN alpha and beta) are potent antiviral agents, understanding the cellular mechanisms by which infected cells produce type I IFN is required to identify novel cellular targets for future antiviral therapies. Notably, a protein called Tumor Necrosis Factor receptor-associated factor-3 (TRAF3) was demonstrated to be an essential mediator of this antiviral response. However, how TRAF3 reacts in response to a viral infection is still not totally understood. We now demonstrate that, through its capacity to interact with other proteins (namely Sec16A and p115) that normally control protein secretion, TRAF3 resides close to the nucleus in uninfected cells, in a region called the ER-to-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC). Following viral infection, the ERGIC reorganizes into small punctate structures allowing TRAF3 to associate with Mitochondrial AntiViral Signaling (MAVS), an essential adaptor of the anti-viral type I IFN response. Thus, our study reveals an unpredicted role of the protein secretion system for the proper localization of TRAF3 and the antiviral response.

## INTRODUCTION

Following exposure to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), the innate immune response and the subsequent inflammatory reaction rely on evolutionarily conserved receptors termed pattern-recognition receptors (PRRs). These signalling receptors can be expressed at the cellular membrane (Toll-like receptors (TLRs) 1, 2, 4, 5, and 6), in acidic endosomes (TLRs 3, 7, 8, and 9), or in the cytoplasmic compartment (the double-stranded RNA (dsRNA)-activated kinase (PKR); the RIG-I-like helicases (RLH): retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I), melanoma differentiation antigen 5 (MDA5), and LGP2; the HIN-200 family members: Absent In Melanoma 2 (AIM2) and interferon (IFN)-inducible IFI16 protein [2]; the DNA-dependent activator of interferon regulatory factors (IRFs) (DAI) and the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) receptors). RIG-I and MDA5 have been characterized as important cytoplasmic sensors for viral RNA [3-6]. Once activated by dsRNA molecules, RIG-I and MDA5 are recruited to the mitochondrial adaptor protein known as Mitochondrial AntiViral Signaling (MAVS) (also called IPS-1, Cardif and VISA) in order to trigger signalling cascades leading to IRF-3 and NF- $\kappa$ B activation, two essential players involved in the establishment of a cellular antiviral state [7-10].

Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factors (TRAFs) are part of a family of adaptor proteins that bridge the intracellular domains of multiple receptors, such as TNFR, IL1R, and TLRs, to downstream effectors involved in the inflammatory and innate immune signalling pathways. The TRAF family is composed of seven members, TRAF1 through TRAF7. They all share a C-terminal TRAF domain, which is composed of a coiled-coil domain followed by a conserved receptor-interacting domain. This domain mediates self-association and interaction with receptors or signalling proteins. Their N-terminal regions are composed of one or more zinc-finger motifs and, with the exception of TRAF1, a RING-finger domain that mediates E3 ubiquitin ligase activity and signalling [11]. All mammalian TRAFs localize to the cytoplasm except TRAF4, which is found in the nucleus. Importantly, gene deletion

studies have identified TRAF3 as a critical mediator involved in the induction of the type I interferons (IFNs) by the RLH pathway [12,13].

TRAF3 has originally been shown to associate with TNF receptors (e.g. BAFFR, CD40, LT $\beta$ R, RANK, CD30, and Fn14), which are activators of the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway [14-17]. TRAF3 acts as a negative regulator in this pathway by promoting the recruitment of the TRAF2-clAP1-clAP2 E3 ligase complex to NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) in order to control its rapid turnover in resting cells [18,19]. However, in the RLH pathway, the adaptor protein TRAF3 acts as a positive regulator. Its interaction with MAVS and TRADD is important to trigger IRF-3 phosphorylation through the adaptor molecule TANK and the IKK-related kinases TBK1 and IKKi [20,21]. The TRADD-mediated recruitment of FADD and RIP1 to MAVS also enhances the interaction between TANK and TRAF3. A model was then proposed in which TRADD simultaneously organizes FADD- and RIP1-mediated NF- $\kappa$ B signalling on one hand and TRAF3- and TANK-mediated IRF-3 signalling on the other [21,22]. However, this possible mechanism of action requires further investigation to determine how TRAF3 is recruited to the mitochondrial adaptor protein MAVS upon viral infection.

Here, we have used a proteomics-based strategy to identify novel TRAF3 interacting proteins that are implicated in the induction of type I IFN. Using this approach, we have identified two novel TRAF3 interactors, Sec16A (also known as KIAA0310) and p115 (also known as USO1), which have characterized roles in the Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi vesicular transport system. Both proteins were shown to play a primary role in the anterograde trafficking at the ER-Golgi interface by influencing the assembly and transport of coat protein complex II (COPII) vesicles. Sec16A assembles on the ER membrane and forms organized scaffold defining ER exit sites (ERES) where COPII assembly occurs [23-25]. The coiled-coil myosin-shaped molecule p115 was demonstrated to be an important tethering adaptor, which mediates vesicle tethering at the ER [26], Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) [27], and in conjunction with tether proteins giantin and GM130 at the cis-Golgi [28,29].

Since novel essential mediators of the type I IFN response were recently found to be associated with the ER or the exocyst pathway, such as STING (also called MITA, ERIS, and MPYS), Sec61 $\beta$  and Sec5 [30-33], we postulated that Sec16A and p115 may exert a similar function through the ER-to-Golgi transport compartments. Co-immunoprecipitation experiments and confocal microscopy confirmed the association and co-localization of TRAF3 with p115 and Sec16A. Importantly, overexpression of p115 or Sec16A increased the type I IFN response, whereas their knockdown impaired the induction of antiviral genes. Interestingly, the Golgi apparatus fragmented into cytoplasmic punctate structures following both RLH and cytoplasmic DNA sensor pathway activation, allowing TRAF3 to colocalize and associate with MAVS. Our study identifies p115 and Sec16A as new scaffold proteins involved in the establishment of the antiviral state.

## **RESULTS**

### **Identification of Sec16A and p115 as new TRAF3 interactors**

In order to find novel players involved in the type I IFN pathway, we have used a functional proteomics approach based on FLAG affinity purification and mass spectrometry analysis (AP/MS). HEK293 cells stably expressing FLAG-TRAF3 were harvested, subjected to IP with an anti-FLAG antibody under native conditions and FLAG-TRAF3 complexes were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In parallel, multiple AP/MS analyses were performed from cells expressing the FLAG alone. Following standard database searches, stringent statistical filtering was performed using SAINT (see Methods). Proteins detected with AvgP  $\geq$  0.7 were manually inspected for frequency of detection across a database of ~1000 AP/MS analyses, and proteins frequently detected in AP-MS experiments were removed. This resulted in the identification of 12 interaction partners for TRAF3, including TBK1, a well-known TRAF3 interactor [12,13]. Surprisingly, Sec16A and p115, two proteins involved in ER-to-Golgi vesicular trafficking, were found to associate with TRAF3 immunocomplexes with a high confidence (Figure 1A and Figure S1).

To confirm these interactions, we performed conventional co-immunoprecipitation experiments by overexpressing the candidate tagged-proteins with FLAG-TRAF3 in 293T cells. The interactions between FLAG-TRAF3 and Myc-p115 or EGFP-Sec16A were clearly detected (Figure 1B-C). To further substantiate the interaction network between TRAF3, Sec16A and p115, we additionally established a pool of HEK293 cells stably expressing FLAG-p115 and analyzed its physiological interactors by FLAG affinity purification and LC-MS/MS, followed by analysis with SAINT. FLAG-p115 was found to be associated with nine proteins (after filtering), including Sec16A and GM130 (also known as GOLGA2), an established physical partner of p115 [34] (Figure 1D and Figure S1). The interaction of EGFP-Sec16A with Myc-p115 was further confirmed by co-immunoprecipitation experiments (Figure 1E). However, endogenous TRAF3 was not recovered in our FLAG-p115 analysis. This result may be explained by the fact that p115 has many higher-abundance interactors and/or is part of alternative complexes independent from TRAF3. However, overexpressed Myc-TRAF3 was recovered from FLAG-p115 complexes when the latter were immunoprecipitated from 293T cells co-expressing both constructs (Figure 1F). The TRAF3 interactome network identified by functional proteomics (Figure S1B) suggests the presence of at least a fraction of TRAF3 in close proximity to the Golgi network.

Members of the TRAF family often share common interacting partners. For example, TRADD and RIP1 strongly bind to TRAF1, TRAF2 and TRAF3 [21,35], whereas the mitochondrial anti-viral signaling protein MAVS interacts with TRAF2, TRAF3 and TRAF6 [10,20]. To verify the binding selectivity of the newly identified TRAF3 interactors, we next performed co-immunoprecipitation experiments in 293T cells overexpressing FLAG-tagged TRAF2, TRAF3 or TRAF6, TRAF molecules involved in type I IFN and inflammatory responses, along with Myc-p115 or EGFP-Sec16A. Only Myc-p115 was found to be enriched in FLAG-TRAF3 immunocomplexes (Figure S1C). A similar result was obtained with EGFP-Sec16A, except that a weak enrichment was observed with TRAF2 when compared to TRAF3 (Figure S1D).

## **TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi transport compartments and behaves like a cis-Golgi matrix protein**

To further validate the interaction between TRAF3 and these new interactors, we next analyzed their subcellular localization by confocal microscopy. The vesicle-tethering protein p115 is known to colocalize and interact specifically with the NH2 terminus of the cis-Golgi protein GM130 ([36] and see Figure 2A, panel 2). Upon ectopic expression of Myc-p115 and FLAG-TRAF3, we observed a co-localization of these two proteins (Figure 2A, panel 1). FLAG-TRAF3 was also observed to localize to the Golgi apparatus where it exhibits a high degree of overlap with the cis-Golgi marker GM130 (Figure 2A, panel 3). p115 was previously reported to be present in the ERGIC, through an interaction involving activated Rab1 [37,38]. This cellular localization of FLAG-p115 can be visualized with the conventional ERGIC marker, ERGIC53 (Figure 2A panel 4). Notably, FLAG-TRAF3 (or Myc-TRAF3 (unpublished data)) was also present in the ERGIC (Figure 2A, panel 5). No significant colocalization was detected between TRAF3 and the ER marker calnexin (Figure 2A, panel 6), the lysosomal compartments (Figure 2A, panel 7) and the mitochondrial network (Figure 2A, panel 8).

In HeLa cells, Sec16A was demonstrated to define ERES [24,25], localizing to punctate structures on the ER membrane. This pattern was reproduced in this study (Figure 2B, panel 1). Since Rab1 recruitment of p115 to ERES [26] represents an essential step for the subsequent docking of ER-derived vesicles to the ERGIC [39], we next examined the colocalization of EGFP-Sec16A and FLAG-p115. The two proteins clearly colocalized at the perinuclear region (Figure 2B, panel 2). FLAG-TRAF3 and EGFP-Sec16A also mainly colocalized at the perinuclear region in HeLa cells (Figure 2B, panel 3). Moreover, a colocalization of FLAG-TRAF3 with endogenous Sec16A at ERES distributed in the cytoplasm could be observed. However, some FLAG-TRAF3 punctae also appeared in close proximity to those containing Sec16A (Figure 2B, panel 4, compare arrows). Ectopic expression of FLAG-TRAF2 and FLAG-TRAF6 revealed that only TRAF3 exhibits a cellular Golgi-

like distribution (Figure S2A) and colocalizes with endogenous Sec16A (Figure S2B) or Myc-p115 (Figure S2C). Importantly, endogenous staining of TRAF3 revealed that the majority of TRAF3 proteins localized to the juxtannuclear region containing both the cis-Golgi marker GM130 and the ERGIC marker ERGIC53 (Figure 2C).

To further confirm the localization of TRAF3 to the Golgi apparatus, we next treated the cells with nocodazole. Microtubule depolymerization is known to result in the reorganization of the Golgi complex into characteristic mini-stacks, which appear as punctate structures throughout the cell [40]. Nevertheless, FLAG-TRAF3 was detected to colocalize with GM130 and Myc-p115 in cells treated with nocodazole (Figure S3, panels 1, 2 and 3). Treatment with brefeldin A (BFA), leads to relocalization of the components of the cis-Golgi matrix to cytoplasmic punctate structures (also called remnants) that appear close to ERES [41,42]. GM130 and p115 are cis-Golgi proteins, which are known to be relocalized to these remnants [41]. FLAG-TRAF3 was also relocated to cytoplasmic remnants upon BFA treatment, where it co-localized with GM130 and Myc-p115 (Figure S3, panels 4 and 5). Altogether, results from our pharmacological experiments and confocal microscopy strongly suggest that TRAF3 localized to ER-to-Golgi transport compartments, where it tightly associates [43,44].

### **TRAF3 localization and interaction with components of the ER-to-Golgi vesicular pathway requires its protein integrity**

It has been proposed that a structurally intact TRAF3 molecule is required for its biological function. Indeed, TRAF3 lacking its N-terminal RING or the C-terminal TRAF domain lacks antiviral activity [20]. We therefore examined the subcellular localization of TRAF3 deletion mutants in reconstituted TRAF3 knockout MEF cells. Removal of the N-terminal Ring Finger domain (Figure 3A, panel 1), the N-terminal Ring and Zinc finger domains (Figure 3A, panel 2) or the C-terminal TRAF domain (Figure 3A, panel 3) resulted in TRAF3 molecules that no longer colocalize with the Golgi marker GM130. Furthermore, coimmunoprecipitation experiments in 293T cells revealed that immunocomplexes containing p115 are detected only with full length TRAF3 and that Sec16A-containing immunocomplexes required at least the



isoleucine zipper and the TRAF domain (Figure 3B). Moreover, TRAF3 is known to interact with several substrates containing a particular motif (PxQxS/T) called the TRAF interaction motif (TIM) [45]. The mutation of two amino acids located in the TIM-binding pocket of TRAF3, Y440 and Q442, abrogates these interactions [20]. Interestingly, a strong interaction was detected between FLAG-TRAF3 Y440/Q442A and Myc-p115 or EGFP-Sec16A (Figures 3C and 3D), implying that this interaction is independent of the TIM motif. Thus, it is not clear yet whether TRAF3 interacts directly with Sec16A or p115 or requires other components such as TFG ([46] and see Figure S1). Collectively, these data suggest that an intact TRAF3 molecule is required for its proper localization and interaction with components of the ER-to-Golgi vesicular pathway.

### **Activation of intracellular RNA and DNA sensors leads to the formation of TRAF3-containing Golgi fragments**

Our data demonstrate that TRAF3 does not associate with the mitochondrial network in resting cells (Figure 2A, panel 8). However, TRAF3 was demonstrated to link the mitochondrial membrane-bound protein MAVS to the activation of TBK1, which is required for IRF3/7 phosphorylation and type I IFN induction in response to viral infection [20,47]. Therefore, we next addressed the subcellular localization of endogenous TRAF3 upon viral infection and RNA/DNA sensor pathway activation. Intracellular delivery of the double-stranded RNA mimicry molecule, poly I:C, or the dsDNA mimicry agent poly dA:dT resulted in disorganization of the ribbon-like structure of the Golgi apparatus, giving rise to the formation of Golgi ministacks containing GM130 (Figure 4A, arrows in panel 2 and 3). Importantly, the localization of endogenous TRAF3 followed these Golgi fragments. Similar observations were made in cells infected with RIG-I inducers, Sendai virus (SeV), Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Influenza virus (Figure 4B).

Additionally, we addressed the association of TRAF3 with p115- and Sec16A-containing complexes upon PAMP exposure. In unstimulated cells, a weak but constitutive association of endogenous TRAF3 with endogenous Sec16A and p115 was detected (Figure 5 A and B). However, upon viral infection or transfection with

poly I:C or poly dA:dT, immunocomplexes containing endogenous TRAF3 were enriched with p115 and Sec16A. Importantly, the induced association of TBK1 with TRAF3 closely mirrored the presence of p115 and Sec16A. (Figure 5B). From these results we hypothesized that the localization of TRAF3 to the ER-to-Golgi compartment and the Golgi fragmentation of the latter into punctate structures might be required for the proper positioning of TRAF3 with MAVS.

### **Sec16A and p115 are required for TRAF3 localization to the ER-to-Golgi transport compartment and the proper recruitment to MAVS**

To verify this hypothesis, loss-of-function experiments were conducted using HeLa cells exposed to siRNA duplexes targeting Sec16A and p115. As previously observed for p115 and Sec16A [24,25,48,49], reducing the expression level of Sec16A or p115 led to a drastic disorganisation of the Golgi paralleled by a relocalization of TRAF3 as observed by the formation of small punctate structures (Figure S4A, panels 2 and 4; Figure S4B, panel 2). However, the majority of these GM130 positive punctae do not colocalize with TRAF3 and thus appear to be different from those observed following dsRNA and dsDNA sensing (compare Figure S4A, panel 4 with Figure 4).

Next we examined the effect of reducing the expression level of Sec16A or p115 on the ability of TRAF3 to colocalize with MAVS upon SeV infection. As expected, TRAF3 localization reorganized into punctate structures following SeV infection, allowing a significant proportion of TRAF3 to colocalize with MAVS (Figure 6A, panel 2). This effect was severely compromised by reducing the expression of Sec16A or p115 (Figure 6A, compare panels 4 and 6 with panel 2). Additionally, co-immunoprecipitation experiments revealed that TRAF3 formed an immunocomplex with MAVS upon SeV infection. Interestingly, silencing the expression level of p115 or Sec16A clearly blunted the ability of TRAF3 to bind to MAVS upon SeV infection (Figures 6B and 6C). Thus loss-of-function experiments targeting p115 and Sec16A led to a mislocalization of TRAF3 and its subsequent incapacity to associate with MAVS upon RLH pathway activation.

This prompted us to ask whether enforced retention of TRAF3 at the ER-to-Golgi compartment could negatively influence the type I IFN response. In order to verify this, a TRAF3 mutant containing a COPI and COPII sorting signal peptide [50], namely “AKKFF” [51], at its C-terminal end was generated and used in confocal microscopy and reporter gene assays. Confocal microscopy experiments revealed that addition of dilysine and dihydrophobic residues to the C-terminal end of TRAF3 resulted in the formation of large TRAF3 aggregates which failed to colocalize with the Golgi marker GM130 upon infection with SeV (Figure 7A). Consequently, the ability of the TRAF3-AKKFF mutant to mediate TRAF3-dependent synergistic activation of the IFN $\beta$  promoter was drastically reduced (Figure 7B), which is likely due to less binding to MAVS (Fig. S5).

Altogether, these results indicate that the localization of TRAF3 to the ER-to-Golgi compartment is involved in the proper positioning of TRAF3 within the mitochondrial network and the induction of type I IFN innate immune response.

### **Sec16A and p115 influence the type I IFN antiviral response at the transcriptional level**

The results presented above suggest a role for the ER-to-Golgi compartment in TRAF3-dependent innate immune response. To investigate whether Sec16A or p115 play a role in the type I IFN response, we overexpressed both proteins in Hec1B cells and assessed NF- $\kappa$ B and IRF-3 transcription factor activation using reporter gene assays. Without any stimulation, overexpression of either protein did not significantly activate the IFN $\beta$  promoter. However, following viral infection, the response was increased in cells overexpressing Sec16A or p115 (Figure 8A). Overexpression of Sec16A and p115 also increased the activation of the ISG56 promoter (IRF3-dependent promoter) (Figure 8B) and the NF- $\kappa$ B-dependent promoter (Figure 8C) following SeV infection. Moreover, we observed a synergistic effect on IFN $\beta$  promoter activity when Sec16A or p115 were co-expressed with MAVS (Figure 8D), TBK1 (Figure 8E) and, interestingly, the TLR3 essential effector TRIF (Figure 8F). Similar results were also obtained for the ISG56 promoter and the NF- $\kappa$ B-dependent

promoter (Figure S6). To further substantiate that the positive transcriptional effect of Sec16A and p115 is dependent on TRAF3, TRAF3-knockout MEF cells were transfected with p115 and Sec16A in the presence or absence of TRAF3 and used in the IFN $\beta$  promoter reporter assay. As suspected, the enhanced promoter activation, induced by ectopically expressed p115 and Sec16A, was entirely dependent on the presence of TRAF3 (Figure 8G). Thus, when expressed in relatively low amounts in Hec1B and MEF cells (not shown), p115 and Sec16A positively participate in a TRAF3-dependent type I IFN response, probably reflecting the ability of a subpopulation of cytoplasmic TRAF3 to further associate with the ER-to-Golgi components under these conditions of mild ectopic expression.

Interestingly, several recent studies have demonstrated that overexpression of p115 or Sec16A in highly transfectable cell lines and depletion of Sec16 or p115 resulted in identical cellular outcomes (i.e. Golgi fragmentation (see Figure S4 and Figure 6) and delayed ER-to-Golgi transport), thereby suggesting that they are required in stoichiometric amounts [24,25,52]. Thus, when ectopically expressed in high amounts in 293T cells, p115 and Sec16A were expected to blunt TRAF3-dependent transcriptional activation. Indeed, transfection of increasing amounts of p115 or Sec16A efficiently blunted TRIF-, RIG-I-, and MAVS-induced IFN $\beta$  promoter activation (Figure S7A-C) as well as NF- $\kappa$ B promoter activation (data not shown). Importantly, adding increasing amounts of TRAF3 in this specific reporter gene assay dose-dependently reversed the inhibitory effect of p115 and Sec16A, once more substantiating the relationship that exist between Sec16A, p115 and TRAF3 (Figure S7D). Moreover, transfection of these plasmids also blunted TBK1-induced ISRE promoter activation (Figure S7E), but did not affect the transactivation response induced by the use of a constitutively active form of IRF-3 (IRF3-5D) (Figure S7F), suggesting that the ER-to-Golgi compartment plays upstream of IRF-3 in type I IFN signalling.

To further confirm the implication of p115 and Sec16A in the type I IFN response, loss-of-function experiments were conducted next. As suspected, an RNAi approach targeting Sec16A and p115, which leads to Golgi fragmentation (see Figure

S4 and Figure 6) significantly diminished *Ifnb*, *ifit1* (ISG56), and *oas1* mRNA induction following poly I:C and poly dA:dT transfection and SeV infection (Figure 9). To verify whether this approach affected IRF-3 activation and the induction of an IRF-3-dependent antiviral protein[53], we next verified the phosphorylation state of IRF-3 and the induction of ISG54 in HeLa cells expressing either shRNA duplexes targeting p115 and Sec16A or cells expressing a non-targeting (NT) shRNA duplex. The phosphorylation of IRF-3 and the expression of ISG54 were readily observed upon SeV infection, poly I:C and poly dA:dT transfection in HeLa cells expressing the NT shRNA duplex but was clearly reduced in cells expressing different shRNA duplexes targeting p115 (Figure 10A) and Sec16A (Figure 10B). Altogether, these data indicate that TRAF3 localization to the ER-to-Golgi vesicular pathway is necessary for a proper type I IFN response.

## DISCUSSION

Gene disruption strategies have revealed that TRAF3 plays a major role in the type I IFN response [12,13]. However, how TRAF3 assembles into functional signalling complexes is still not fully understood. In general, TRAF3 is thought to reside in the cytosol and translocate to surface membrane receptors upon engagement of CD40 or other TNFR family members [54]. Akin to its role in MyD88-dependent cytokine production and TRIF-dependent type I IFN production [55], TRAF3 conceivably also has the capacity to associate with endosomal compartments enriched in TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 and TLR9 receptors [56]. Additionally, upon RLH activation TRAF3 interacts with MAVS and TRADD to trigger IRF-3 phosphorylation through the adaptor molecule TANK and the IKK-related kinases TBK1 and IKKi [20,21]. However, how TRAF3 associates with MAVS upon RLH activation remains unanswered.

Herein, we report that TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi compartments through its ability to interact with p115- and Sec16A-containing complexes. A pharmacological approach using the microtubule depolarizing agent nocodazole led to the redistribution of TRAF3 into small punctate cytoplasmic structures discrete from the ER along with both Golgi matrix proteins p115 and GM130. Both the structure and

positioning of the Golgi apparatus have been shown to be highly dependent on the microtubule cytoskeleton [57]. Interestingly, a link between TRAF3 and the microtubule network has been already established in a previous study through its interaction with Microtubule-Interacting Protein that associates with TRAF3 (MIP-T3) [58]. TRAF3 was dissociated from this complex upon CD40L stimulation and, consequently, it was suggested that microtubule association of TRAF3 could be responsible for directing TRAF3 to defined membrane microdomains in the cell. A similar scenario is proposed here where, in response to viral infection, the association of TRAF3 with complexes containing p115 and Sec16A at the ER-to-Golgi vesicular pathway may play an important role in positioning TRAF3 with MAVS (see Figure 11). Indeed, the following findings suggests a role for Sec16A and p115 in the TRAF3-mediated RLH type I IFN response: (1) Sec16A and p115 are found in immunocomplexes containing TRAF3, but not TRAF2 or TRAF6; (2) inactivation of TRAF3 by deletion of its N-terminal RING finger domain and the C-terminal TRAF domain displaces TRAF3 from the ER-Golgi transport compartments; (3) in non-treated cells, TRAF3 colocalizes and tightly associates with p115, Sec16A, ERGIC53 and GM130, markers of the ER-to-Golgi vesicular compartment; (4) activation of the RLH pathway leads to reorganization of the Golgi apparatus into punctate structures containing TRAF3 and GM130; (5) an increased association between TRAF3, Sec16A, p115 and TBK1 is observed in virally-infected, dsRNA- and dsDNA-transfected cells; (6) mild overexpression of both proteins enhances SeV-, TBK1- and MAVS-stimulated IFN $\beta$ , ISG56 and NF- $\kappa$ B promoter induction; (7) knocking down the expression level of p115 or Sec16A affects the cellular distribution of TRAF3, impairs its capacity to associate with MAVS and diminishes the type I IFN response following poly I:C or polydA:dT transfection and SeV infection; and (8) enforced retention of TRAF3 at the ER-to-Golgi compartment by the addition of a COPI and COP II sorting signal peptide impairs TRAF3 recruitment to the cis-Golgi and diminishes the type I IFN response. Thus, we propose that these two trafficking proteins, Sec16A and p115, form a complex with TRAF3 at ER-to-Golgi transport compartments in order to ensure its proper recruitment to the mitochondrial network during a viral infection. Interestingly, enforced expression of Sec16A or p115 also increases TRIF-mediated

IFN $\beta$  promoter activation, reinforcing the role for the ER-to-Golgi vesicular compartment in TLR3 and TLR4 signalling, as recently reviewed [59].

In support of our findings, the ER-to-Golgi transport compartment seems to also host several proteins involved in type I IFN signalling such as TRADD [21], the translocon [31] and potentially the exocyst [32] (Clement and Servant, unpublished observations). How these proteins cooperate with TRAF3 at the ER-to-Golgi transport compartments is currently unclear and will be the objective of future studies. Nevertheless, all these data suggest a model where vesicles and/or membranes originating from reorganized ER-to-Golgi compartments come in close proximity with the mitochondrial network in order to facilitate the assembly of a functional MAVS signalling complex.

In addition to its role in the RNA sensing pathways, STING is now considered an important effector of innate immune signalling in response to DNA pathogens [60]. Interestingly, STING is an ER-resident protein, which in response to dsDNA treatment, was recently demonstrated to traffic from the ER to the Golgi [61,62] giving rise to punctate structure formation [62]. It is likely that the use of dsDNA (polydA:dT) used in our study might activate both the RNA-dependent pathway (through RNA polymerase III [63]) and the recently described DNA-dependent pathway (through IFI16 [2]), allowing TRAF3-loaded punctae to interact with both MAVS and STING respectively for proper innate immune signalling (Figure 11). Even though this needs to be investigated further, we speculate that the membranous network composed of the ER, Golgi and mitochondria provides a convenient platform on which antiviral cell-signalling complexes are arranged and optimally activated.

It is noteworthy that, as a common feature, plus-stranded RNA viruses have the ability to induce cytoplasmic membrane rearrangements that facilitate their replication. Consequently, the formation of these RNA replication complexes results in dramatic reorganization of the secretory pathway of host cells [64]. For example, poliovirus-infected cells accumulate membranous vesicles derived from COPII vesicles [65] whereas Kunjin virus induces “convoluted membranes” that contain markers from the ERGIC [66]. The precise role for this internal membrane rearrangement in the virus propagation and virus-host interaction requires further

investigation. Nevertheless, localization of TRAF3 and TRADD to these vesicular transport compartments could represent a cellular strategy to increase the rate of RNA detection and the formation of an effective signalling complex at the mitochondrial membrane. The observation that TRADD translocates from the cytoplasm to the mitochondria during Influenza A virus infection supports this model [67]. Additionally, recent observations highlight the fact that viruses have evolved a variety of mechanisms involving the Golgi apparatus to specifically block TRAF3 recruitment into a functional signalling complex. Notably, the SARS Coronavirus M protein, a Golgi localized protein, was recently found to impede the formation of a TRAF3-TANK-TBK1/IKKi complex at the Golgi apparatus [68]. The NY-1 strain Hantavirus glycoprotein (Gn) was also shown to disrupt TRAF3-TBK1 interaction by interacting with TRAF3 through its cytoplasmic tail [69].

The notion of cellular proximity to favor exchanges and signalling events between organelles has been an intense field of interest for many years. Recently, mitofusin 2 present on the ER was shown to tether the ER to mitochondria in order to promote efficient  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into the mitochondria for oxidative phosphorylation purposes. Interestingly, mitofusin 2 was also shown to inhibit RLH pathway signalling by interacting with the C-terminal of MAVS [70]. Furthermore, the Golgi localization of the glycolipid GD3 is important for its transport to the mitochondria after TNF- $\alpha$  stimulation [71,72]. Membrane scrambling between Golgi and mitochondria following Fas stimulation is another example pointing to the connection between different cellular organelles [73]. Moreover, signalling at the Golgi apparatus and endosomes has been observed for different types of membrane-bound receptors [56,74] and protein kinase cascades [75].

Although Bouwmeester and colleagues reported an NF- $\kappa$ B-inducing kinase-dependent interaction between Sec16A and NF- $\kappa$ B 2/p100 in an exhaustive study mapping the human TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal transduction network [76], a role for the ER-to-Golgi vesicular pathway in RLH-induced innate immune response was still unknown until now. Future characterization of the TRAF3 interactome will



undoubtedly help to understand the molecular relevance of the specific subcellular localization of TRAF3 for an optimal type I IFN response.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Reagents, antibodies and plasmids.** Commercial anti-GM130 antibody was purchased from BD Transduction (San Jose, CA). The monoclonal anti-FLAG epitope (M2), the polyclonal anti-FLAG and the anti- $\beta$ -actin (clone AC-74) were obtained from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). The c-Myc (9E10) monoclonal antibodies, as well as the polyclonal p115 (H-300) and TRAF3 (C-20, H-20, and G-6) antibodies were purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). The anti-GFP (monoclonal 1218) antibody and the polyclonal goat anti-GFP antibody were obtained from ABCAM (Cambridge, MA) and US Biological (Swampscott, MA) respectively. The anti-ERGIC53 and anti-calnexin antibodies were from Enzo Life Sciences, anti-p-IRF3 Ser398 was from Millipore (Billerica, MA) and anti-ISG54 was from Novus Biologicals (Littleton, CO). The polyclonal anti-Sec16A and p115 antibodies were obtained from Bethyl Laboratories and Santa Cruz. The plasmid encoding for EGFP-Sec16A was a kind gift of Dr. David Stephens (University of Bristol, UK). Human TRAF3 and p115 cDNAs were amplified from the MGC bank collection and respectively subcloned in pcDNA3 and pTag2B (FLAG) or pTag3B (Myc) vectors (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Human TRAF6 cDNAs were purchased from Origene (Rockville, MD) and subcloned in the pTag2B/3B vectors. The pFLAG-CMV2-TBK1 and pFLAG-TRAF3 Y440/Q442A were gifts from Drs. John Hiscott (McGill University). pcDNA3.1-FLAG-MAVS construct was from Rongtuan Lin (McGill University). The pcDNA3-His-TRIF construct was from Dr. Daniel Lamarre (Université de Montréal). The pRK5-TRAF2-FLAG was obtained from Dr. Nathalie Grandvaux (Université de Montréal). pFLAG-CMV2 TRAF3 deletion mutants (1-117, 1-381, 114-568, 259-568 and 389-568) were from Dr. Carl Ware (La Jolla Institute for Allergy and Immunology). The IFN $\beta$  reporter plasmid, pGL3-IFN- $\beta$ -LUC was described previously [77] as well as the ISG56-luciferase [78] and the NF- $\kappa$ B p2(2)TK reporter plasmids [77]. The pFLAG-TRAF3 mutant with C-terminal retention motif AKKFF was generated by PCR and subcloned in pcDNA3.1 (+) and pMRX-ires-puro (a kind gift from Dr. Shoji Yamaoka, Tokyo

Medical and Dental University, Japan). Poly I:C was purchased from GE HealthCare (Waukesha, WI) and transfected with Lipofectamine2000 (Invitrogen) at final concentrations of 1.0 to 2.5µg/ml. Poly dA:dT was from InvivoGen and used at 1µg/ml. BFA and nocodazole were obtained from Calbiochem and used at a final concentration of 5 µg/ml.

**Cell culture, transfection and infections.** HeLa, Hec1B, HEK 293, HEK 293T, HEK 293 QBI cell lines and TRAF3 knockout MEF cells (a kind gift from Dr. John Hiscott, McGill University) were maintained in Dulbecco's modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. All DNA transfections in human cell lines were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transient transfection of immortalized MEF cells was performed by microporation with the Microporator Apparatus (Montreal Biotech) according to the manufacturer's instructions. Sendai virus (SeV) was obtained from Specific Pathogen-Free Avian Supply (North Franklin, CT) and used at 200 HAU/ml. Respiratory Syncytial Virus (RSV.A2) (a kind gift from Nathalie Grandvaux, Université de Montréal) was used at a MOI of 3. Influenza A (PR8) virus was a kind gift from Dr. Rongtuan Lin (McGill University).

**Immunoblot analysis and Immunoprecipitation.** Preparation of whole cell extracts, co-immunoprecipitation studies, Native-PAGE and immunoblot analysis were performed as described previously [79]. A RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM sodium fluoride, 40 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitors mixture (Sigma)) was used for the extraction of the TRAF3 AKKFF mutant. Antibodies were used as recommended by the manufacturers.

**Confocal microscopy.** For immunofluorescence, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 20 min followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 5 min. Cells were washed with PBS (pH 7.2) and blocked with 0.5%

BSA in PBS. Anti-FLAG antibody (M2, Sigma) was used at 1:1000, anti-GM130; 1:100, anti-ERGIC53; 1:100, anti-FLAG polyclonal antibody; 1:400, anti-GFP (ABCAM); 1:100, anti-Myc 9E10; 1:100, anti-TRAF3; 1:200, anti-P115; 1:100, anti-Sec16A; 1:200, and anti-MAVS; 1:100. Secondary fluorophore-conjugated antiserum (Alexa Fluor 488 and 564) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR) and used at 1:500 in PBS 0.5% BSA. The nucleus was revealed by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. The confocal micrographs represent a single optical section through the plane of the cell. Images were acquired with LSM v3.2 software (Zeiss) on a LSM 510 inverted microscope (Zeiss, Germany) with a plan-apochromat 63x/1.4 oil disc lens using 405 nm in conjunction with a LP 505 for DAPI, 488 nm in conjunction with a BP 505-530 for Alexa 488, and 543 nm in conjunction with BP 560-615 for Alexa 568. Images were assembled in Adobe Photoshop CS 3.0.

**FLAG affinity purification and mass spectrometric analysis.** FLAG-affinity purification was performed as described previously [80] with the following modifications. Detergent concentration in the lysis buffer was 0.5% NP-40; the lysis buffer was added at 4 ml/g wet cell pellet, and cells were subjected to passive lysis (30 minutes) followed by one freeze-thaw cycle and centrifugation. Immunoprecipitation was performed on the cleared lysate by adding 25  $\mu$ l packed FLAG M2 beads (Sigma) and incubating for two hours. Beads were washed three times in lysis buffer, and three times in 50 mM ammonium bicarbonate. Samples were eluted with ammonium hydroxide, lyophilized in a speed-vac, resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8 - 8.3), and incubated at 37°C with trypsin overnight. The ammonium bicarbonate was evaporated, and the samples were resuspended in HPLC buffer A2 (2% acetonitrile, 0.1% formic acid), then directly loaded onto capillary columns packed in-house with Magic 5  $\mu$ m, 100A, C18AQ. MS/MS data was acquired in data-dependent mode (over a 2 hr acetonitrile 2 - 40% gradient) on a ThermoFinnigan LTQ equipped with a Proxeon NanoSource and an Agilent 1100 capillary pump. Acquired RAW files were converted to mgf format using ProteoWizard. The searched database was human RefSeq (version 45). \*.mgf files

were searched with the Mascot search engine (version 2.3) using the following variable parameters: semi trypsin digestion, one missed cleavage allowed, asparagine deamidation and methionine oxidation. The fragment mass tolerance was 0.6 Da (monoisotopic mass), and the mass window for the precursor was +/- 3 Da (only +2 and +3 charge ions were processed). Mascot results were parsed for further analysis into a LIMS system developed at the Samuel Lunenfeld Research Institute [81]. Scoring of specific interactors for FLAG-TRAF3 and FLAG-p115 was performed using the statistical tool SAINT (Significance Analysis of INTERactome). SAINT converts label free quantification, such as spectral counts, for each prey protein identified in a purification of a bait into the probability of true interaction between the two proteins [82,83]. SAINT can calculate a probability of interaction even for proteins frequently detected in AP-MS experiments, providing that a quantitative enrichment is detected in the purification of the sample [84]. For each bait, two biological replicates were used. Twelve negative control runs (consisting of cells expressing the FLAG tag alone) were processed in parallel and combined into 5 virtual controls for SAINT modeling. SAINT calculates scores differently depending on the availability of negative control purifications, and thus the implementation for spectral count data incorporating control purification data was used (details are described in [82]). The probability score was first computed for each prey in independent biological replicates separately (iProb). Then the final probability score for a pair of bait and prey proteins was calculated by taking the average of the probabilities in individual replicates (AvgP); final results with AvgP $\geq$ 0.5 were further inspected. A manual cross-reference against a database containing >1000 independent FLAG AP-MS runs was finally performed to identify potential proteins frequently detected in AP-MS experiments and were removed from the final dataset.

**RNA Interference.** HeLa cells were transfected with 40 nM siRNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen). siRNA p115, Sec16A and the non-targeting pool siRNA duplexes were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Sequences are as follow: Sec16A (#3: 5'-ggagagcuuucgcgugua-3'; #4: 5'-ccucaguccucuagcgugu-3') and p115 (#3: 5'-guuauuauguggagguuug-3'; #4: 5'-ugauggagguauaguaguu-3').

shRNA vectors targeting p115 (TRCN0000065070, TRCN0000065071, TRCN0000065072) and Sec16A (TRCN0000246015, TRCN0000246016) and non-Targeting control shRNA were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Lentiviral vector production and transduction was conducted as described previously [85].

**RNA isolation and qPCR Analysis.** After stimulation, total RNA was extracted from HeLa cells using Trizol reagent (Invitrogen). 2 µg of RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. SYBR green PCR reactions were performed using 2 µl of cDNA samples (25-50 ng), 5 µl of the Fast SYBR qPCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10 pmol of each primer in a total volume of 10 µl. The IFN qRT-Primer set for real-time quantification of the IFN response (IFN $\beta$ , ISG56 (*ifit1*) and OAS1) was purchased from InvivoGen (San Diego, CA). The ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to measure the amplification level. All reactions were run in triplicate and the average Cts were used for quantification. TBP (TATA binding protein) was used as endogenous control.

**Reporter Gene Assays.** Subconfluent Hec1B, HEK 293 QBI and 293T cells in 24 well-plates were transfected with 25 ng of pRL-TK reporter (renilla luciferase for internal control) and 125 ng of pGL3-IFN- $\beta$ -LUC, pGL3-ISG56-LUC, pGL3-ISRE or pGL3-NF- $\kappa$ B-LUC using the conventional CaPO<sub>4</sub> transfection protocol (for Hec1B, HEK 293 QBI cells and 293T cells) or Lipofectamine 2000 (for TRAF3 knockout MEF cells). Cells were harvested 24h post-transfection, lysed in passive lysis buffer (Promega, Madison, WI), and assayed for dual-luciferase activity using 10 µl of lysate according to the manufacturer's instructions. All firefly luciferase values were normalized to renilla luciferase to control for transfection efficiency.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparison of two groups

was carried out using a two-tailed unpaired *t*-test, and comparison of more than two groups was carried out with one-way ANOVA and a Bonferroni posttest. Statistical significance was accepted at a *P*-value below 0.05.

### **ID NUMBERS FOR GENES**

TRAF2; 7186, TRAF3; 7187, TRAF6; 7189, Sec16A; 9919, p115; 8615, MAVS; 57506, STING; 340061, ISG56; 3434, ISG54; 3433, TRIF; 148022, TBK1; 29110, RIG-I; 23586, MDA5; 64135, LGP2; 79132, AIM2; 9447, IFI16; 3428, IRF3; 3661, NIK; 9020, TRADD; 8717, TANK; 10010, IKKi; 9641, GM130; 2801, RIP1; 8737, IFN $\beta$ ; 3456, NF $\kappa$ B; 4790, OAS1; 4938, ERGIC53; 3998, calnexin; 821, Sec61 $\beta$ ; 10952; Sec5; 55770.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to Dr. Nathalie Grandvaux, Dr. Rongtuan Lin, Dr. David Stephens, Dr. Daniel Lamarre, and Dr. John Hiscott, for sharing reagents. We also thank Monique Arts for technical and editing assistance.

### **ABBREVIATIONS LIST**

ds: double-stranded; TRAF: Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factor; TBK1: TANK-Binding Kinase-1; IFN: interferon; ISG: IFN-stimulated genes; MAVS: Mitochondrial AntiViral Signaling; RIG-I: Retinoic acid-inducible gene 1 protein; IRF-3: IFN Regulatory Factor-3; TRADD: tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein; IKK: IkappaB kinase; TANK : TRAF family member-associated NF $\kappa$ B activator; STING: Stimulator of interferon genes protein; ERGIC: ER-Golgi intermediate compartment; ERES: ER exit site; MEF: mouse embryonic fibroblasts; TLR: Toll-Like Receptors; RLH: RIG-I-like helicases; COPII: coat protein complex II.

## REFERENCES

1. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM (2011) Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol* 29: 185-214.
2. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, et al. (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 11: 997-1004.
3. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, et al. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23: 19-28.
4. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, et al. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.
5. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, et al. (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8459-8464.
6. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, et al. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17264-17269.
7. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, et al. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6: 981-988.
8. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, et al. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437: 1167-1172.
9. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122: 669-682.
10. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, et al. (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 19: 727-740.
11. Bradley JR, Pober JS (2001) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20: 6482-6491.

12. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, et al. (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439: 204-207.
13. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, et al. (2006) Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439: 208-211.
14. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3: 958-965.
15. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, et al. (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 21: 5375-5385.
16. Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, et al. (2005) TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2874-2879.
17. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, et al. (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17: 525-535.
18. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, et al. (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9: 1364-1370.
19. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, et al. (2008) Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9: 1371-1378.
20. Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, et al. (2006) Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* 25: 3257-3263.
21. Michallet MC, Meylan E, Ermolaeva MA, Vazquez J, Rebsamen M, et al. (2008) TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* 28: 651-661.



22. Pietras EM, Cheng G (2008) A New TRADDition in intracellular antiviral signaling. *Sci Signal* 1: pe36.
23. Bhattacharyya D, Glick BS (2007) Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol Biol Cell* 18: 839-849.
24. Inuma T, Shiga A, Nakamoto K, O'Brien MB, Aridor M, et al. (2007) Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 282: 17632-17639.
25. Watson P, Townley AK, Koka P, Palmer KJ, Stephens DJ (2006) Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic* 7: 1678-1687.
26. Allan BB, Moyer BD, Balch WE (2000) Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289: 444-448.
27. Alvarez C, Fujita H, Hubbard A, Sztul E (1999) ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J Cell Biol* 147: 1205-1222.
28. Beard M, Satoh A, Shorter J, Warren G (2005) A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* 280: 25840-25848.
29. Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, et al. (1998) A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* 140: 1013-1021.
30. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, et al. (2008) The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29: 538-550.
31. Ishikawa H, Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455: 674-678.
32. Chien Y, Kim S, Bumeister R, Loo YM, Kwon SW, et al. (2006) RalB GTPase-mediated activation of the I $\kappa$ B family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* 127: 157-170.
33. Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, et al. (2009) ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8653-8658.

34. Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G (1997) The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* 89: 445-455.
35. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4: 387-396.
36. Seemann J, Jokitalo EJ, Warren G (2000) The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Mol Biol Cell* 11: 635-645.
37. Moyer BD, Allan BB, Balch WE (2001) Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering. *Traffic* 2: 268-276.
38. Marra P, Maffucci T, Daniele T, Tullio GD, Ikehara Y, et al. (2001) The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment. *Nat Cell Biol* 3: 1101-1113.
39. Cao X, Ballew N, Barlowe C (1998) Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J* 17: 2156-2165.
40. Thyberg J, Moskalewski S (1985) Microtubules and the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 159: 1-16.
41. Seemann J, Jokitalo E, Pypaert M, Warren G (2000) Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* 407: 1022-1026.
42. Lippincott-Schwartz J, Donaldson JG, Schweizer A, Berger EG, Hauri HP, et al. (1990) Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60: 821-836.
43. Waters MG, Clary DO, Rothman JE (1992) A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J Cell Biol* 118: 1015-1026.
44. Nelson DS, Alvarez C, Gao YS, Garcia-Mata R, Fialkowski E, et al. (1998) The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *J Cell Biol* 143: 319-331.

45. Brodeur SR, Cheng G, Baltimore D, Thorley-Lawson DA (1997) Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* 272: 19777-19784.
46. Witte K, Schuh AL, Hegermann J, Sarkeshik A, Mayers JR, et al. (2011) TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 13: 550-558.
47. Guo B, Cheng G (2007) Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* 282: 11817-11826.
48. Sohda M, Misumi Y, Yoshimura S, Nakamura N, Fusano T, et al. (2005) Depletion of vesicle-tethering factor p115 causes mini-stacked Golgi fragments with delayed protein transport. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1268-1274.
49. Puthenveedu MA, Linstedt AD (2004) Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1253-1256.
50. Dancourt J, Barlowe C (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* 79: 777-802.
51. Das Sarma J, Wang F, Koval M (2002) Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization. *J Biol Chem* 277: 20911-20918.
52. Sohda M, Misumi Y, Yoshimura S, Nakamura N, Fusano T, et al. (2007) The interaction of two tethering factors, p115 and COG complex, is required for Golgi integrity. *Traffic* 8: 270-284.
53. Andersen J, VanScoy S, Cheng TF, Gomez D, Reich NC (2008) IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection. *Genes Immun* 9: 168-175.
54. Karin M, Gallagher E (2009) TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF3 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev* 228: 225-240.
55. Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DA, et al. (2010) Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* 11: 70-75.

56. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, et al. (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9: 361-368.
57. Thyberg J, Moskalewski S (1999) Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 246: 263-279.
58. Ling L, Goeddel DV (2000) MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *J Biol Chem* 275: 23852-23860.
59. McGettrick AF, O'Neill LA (2010) Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol* 22: 20-27.
60. Barber GN (2011) Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol* 23: 10-20.
61. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN (2009) STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461: 788-792.
62. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, et al. (2009) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20842-20846.
63. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138: 576-591.
64. Roosendaal J, Westaway EG, Khromykh A, Mackenzie JM (2006) Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J Virol* 80: 4623-4632.
65. Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, et al. (2001) Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J Virol* 75: 9808-9818.
66. Mackenzie JM, Westaway EG (2001) Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* 75: 10787-10799.

67. Ohman T, Rintahaka J, Kalkkinen N, Matikainen S, Nyman TA (2009) Actin and RIG-I/MAVS signaling components translocate to mitochondria upon influenza A virus infection of human primary macrophages. *J Immunol* 182: 5682-5692.
68. Siu KL, Kok KH, Ng MH, Poon VK, Yuen KY, et al. (2009) Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3-TANK-TBK1/IKK complex. *J Biol Chem*.
69. Alff PJ, Sen N, Gorbunova E, Gavrillovskaya IN, Mackow ER (2008) The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J Virol* 82: 9115-9122.
70. Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, et al. (2009) Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* 2: ra47.
71. Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Calvo M, Enrich C, et al. (2002) Trafficking of ganglioside GD3 to mitochondria by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 277: 36443-36448.
72. Tomassini B, Malisan F, Franchi L, Nicolo C, Calvo GB, et al. (2004) Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *FASEB J* 18: 1553-1555.
73. Ouasti S, Matarrese P, Paddon R, Khosravi-Far R, Sorice M, et al. (2007) Death receptor ligation triggers membrane scrambling between Golgi and mitochondria. *Cell Death Differ* 14: 453-461.
74. McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, et al. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290: 1574-1577.
75. McKay MM, Morrison DK (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113-3121.
76. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, et al. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6: 97-105.
77. Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, et al. (2001) Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* 276: 355-363.

78. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, et al. (2002) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* 76: 5532-5539.
79. Clement JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, et al. (2008) Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. *J Virol* 82: 3984-3996.
80. Chen GI, Gingras AC (2007) Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. *Methods* 42: 298-305.
81. Liu G, Zhang J, Larsen B, Stark C, Breitkreutz A, et al. (2010) ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics. *Nat Biotechnol* 28: 1015-1017.
82. Choi H, Larsen B, Lin ZY, Breitkreutz A, Mellacheruvu D, et al. (2011) SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* 8: 70-73.
83. Breitkreutz A, Choi H, Sharom JR, Boucher L, Neduva V, et al. (2010) A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* 328: 1043-1046.
84. Skarra DV, Goudreault M, Choi H, Mullin M, Nesvizhskii AI, et al. (2011) Label-free quantitative proteomics and SAINT analysis enable interactome mapping for the human Ser/Thr protein phosphatase 5. *Proteomics* 11: 1508-1516.
85. Baril M, Racine ME, Penin F, Lamarre D (2009) MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Virol* 83: 1299-1311.
86. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M, Jr. (2011) Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14590-14595.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Identification of p115 and Sec16A as new TRAF3 interacting proteins. **(A)** HEK293 cells were stably transfected with pcDNA3-FLAG-TRAF3 or pcDNA3-FLAG alone. After G418 selection, the cells were lysed and subjected to AP/MS as described in Methods. The complete list of interactors is shown in Figure S1A. Data for p115 and Sec16A, which were not detected in immunoprecipitates of control cells, are shown here. MS; mascot score, TP; average total number of peptides (spectral counts) identified, UP; number of unique peptides observed; data from two biological replicates are shown. **(B)** Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Myc-p115 to FLAG-TRAF3 when coexpressed in 293T cells. One of three independent experiments with similar results is shown. **(C)** Co-immunoprecipitation experiments showing the association of FLAG-TRAF3 to EGFP-Sec16A when coexpressed in 293T cells. One of three independent experiments with similar results is shown. **(D)** AP/MS analysis from cells stably transfected with pcDNA3-FLAG-p115 or pcDNA3-FLAG vector and analyzed as described in A). **(E)** Co-immunoprecipitation experiments showing the association of Myc-p115 to EGFP-Sec16A and **(F)** Myc-TRAF3 to FLAG-p115 when coexpressed in 293T cells. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure 2.** TRAF3 localizes to the ER-to-Golgi transport compartments and behaves like a cis-Golgi protein. **(A)** Confocal microscopy performed in HeLa cells on FLAG-TRAF3 and Myc-p115 (panel 1), FLAG-p115 and GM130 (panel 2), FLAG-TRAF3 and GM130 (panel 3), FLAG-p115 and ERGIC53 (panel 4), FLAG-TRAF3 and ERGIC53 (panel 5), FLAG-TRAF3 and Calnexin (panel 6), FLAG-TRAF3 and lysotracker (panel 7) or mitotracker (panel 8). The nuclei were stained utilizing DAPI. One of three independent experiments with similar results is shown. Bars represent 10  $\mu$ m. **(B)** Confocal microscopy performed in HeLa cells on EGFP-Sec16A and calnexin (panel 1), EGFP-Sec16A and FLAG-p115 (panel 2), EGFP-Sec16A and FLAG-TRAF3 (panel 3) and FLAG-TRAF3 and endogenous Sec16A (panel 4). **(C)** HeLa cells were stained for endogenous TRAF3 and GM130 (panel 1) or endogenous TRAF3 and ERGIC53 (panel 2) before analysis via confocal microscopy. The nuclei

were stained utilizing DAPI. Bars represent 5  $\mu$ m. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure 3.** TRAF3 interaction with sec16A or p115 requires its protein integrity.

**(A)** Confocal microscopy analysis of HeLa cells expressing FLAG-TRAF3 deltaRING (panel 1). Additionally, TRAF3 knockout MEF cells were transfected with FLAG-TRAF3 259-568 (panel 2), FLAG-TRAF3 1-381 (panel 3), or FLAG-TRAF3 WT (panel 4) and stained for GM130, FLAG-tag, and DAPI (nucleus) before analysis via confocal microscopy. Bars represent 5  $\mu$ m. One of three independent experiments with similar results is shown. **(B)** Co-immunoprecipitation experiments showing the association of EGFP-Sec16A and Myc-p115 to FLAG-TRAF3 deletion mutants when coexpressed in 293T cells (upper and lower parts from the Western blot are from the same gel). One of three independent experiments with similar results is shown. The bottom panel is a linear representation of TRAF3 deletion mutants and their capacity to interact with p115 or Sec16A. Numbers indicate the position of amino acids in TRAF3. **(C-D)** Co-immunoprecipitation experiments showing the association of FLAG-TRAF3 WT and Y440/Q442A with Myc-p115 or EGFP-Sec16A immunocomplexes when coexpressed in 293T cells.

**Figure 4.** Activation of intracellular RNA and DNA sensors leads to the formation of TRAF3-containing Golgi fragments. Confocal microscopy of HeLa cells stained for endogenous TRAF3, GM130, and the nucleus (DAPI) upon no treatment (**A**, panel 1), poly I:C treatment (**A**, panel 2) or poly dA:dT for 4h (**A**, panel 3), infection with SeV (200 HAU/ml) (**B**, panel 1), RSV (MOI=3) (**B**, panel 2), or Influenza A virus for 4h (**B**, panel 3). Arrows indicate the relocalization and the colocalization of the Golgi apparatus with TRAF3 upon treatment. Bars represent 5  $\mu$ m. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure 5.** p115 and Sec16A associate with TRAF3 following cytosolic RNA and DNA sensor activation. **(A)** Whole-cell lysates (HeLa cells) were prepared and subjected to immunoprecipitation assays using TRAF3 (H-20) or isotype control antibodies



followed by immunoblotting for the presence of p115, Sec16A, and TRAF3. **(B)** HeLa cells were treated as indicated for different periods of time. Whole-cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation assays using TRAF3 (H-20) antibody followed by immunoblotting for the presence of p115, Sec16A, TBK1 and TRAF3. The Native-PAGE assay was conducted on the same cellular extracts to demonstrate the dimerization and activation of IRF-3 upon indicated treatments. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure 6.** Sec16A and p115 are required for the proper positioning of TRAF3 along the mitochondrial network. **(A)** Confocal microscopy of HeLa cells transfected with 40 nM nonsilencing RNA duplexes (panels 1 and 2) or 40 nM siRNA duplexes that specifically target Sec16A (panels 3 and 4) or p115 (panels 5 and 6) and stained for MAVS and endogenous TRAF3 upon no treatment (panels 1, 3 and 5) or SeV infection (200 HAU/ml) for 4h (panels 2, 4 and 6). Arrows indicate the colocalization of TRAF3 with MAVS. Bars represent 5  $\mu$ m. One of three independent experiments with similar results is shown. **(B)** p115 and Sec16A were silenced in HeLa cells as described in **(A)** and infected with SeV for indicated periods of time. Whole-cell lysates were subjected to immunoprecipitation using an anti-TRAF3 (H-20) antibody followed by immunoblotting for the presence of MAVS and TRAF3. Immunoblot analysis against p115, Sec16A, TRAF3 and SeV proteins are also shown (Input). One of two independent experiments with similar results is shown. **(C)** Densitometric analysis of the binding activity of MAVS to TRAF3 presented in Figures 6B. Data represent the ratio of immunoprecipitated MAVS over immunoprecipitated TRAF3 and are means  $\pm$  S.D. of two experiments.

**Figure 7.** Enforced retention of TRAF3 at the ER-to-Golgi compartment negatively regulates type I IFN response. **(A)** Confocal microscopy analysis of FLAG-tag and GM130 performed in HeLa cells expressing FLAG-TRAF3 (panels 1 and 2) or FLAG-TRAF3-AKKFF (panels 3 and 4) upon no infection (panels 1 and 3) or SeV infection (200 HAU/ml) (panels 2 and 4) for 4h. The nuclei were stained with DAPI. Arrows indicate TRAF3 aggregates. One of two independent experiments with similar results

is shown. Bars represent 10  $\mu$ m. **(B)** Hec1B cells were co-transfected with luciferase reporter plasmid pGL3-IFN $\beta$  (250 ng) and indicated plasmids (250 ng) for 24h and infected with SeV (200 HAU/ml) for 16h. Hec1B cells were also co-transfected with luciferase reporter plasmid pGL3-IFN $\beta$  (250 ng), empty vector or MAVS or TRIF (25 ng) along with indicated plasmids (250 ng) for 24h. Relative luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. Mean values  $\pm$  S.D. of triplicate determinations are shown (\*\*\*)  $P < 0.001$ ). One of four independent experiments with similar results is shown. Cellular extracts from transfected Hec1B cells were also prepared and subjected to immunoblot analysis using indicated antibodies (right lower panel).

**Figure 8.** Sec16A and p115 influence the type I IFN antiviral response at the transcriptional level. **(A-C)** Hec1B cells were co-transfected with the indicated luciferase reporter genes together with 125 ng of empty vector, Myc-p115 or EGFP-Sec16A. Data are expressed as fold-induction following SeV infection (16h) over the corresponding non-infected condition. **(D-F)** Hec1B cells were co-transfected with pGL3-IFN $\beta$ -luciferase reporter gene together with 125 ng of empty vector, Myc-p115 or Sec16A and 15 ng of FLAG-MAVS **(D)**, 100 ng of FLAG-TBK1 **(E)**, or 15 ng of His-TRIF **(F)**. Data represent the fold-activation over the corresponding vector control. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. The data are representative of at least four different experiments with similar results. **(G)** TRAF3 knockout MEF cells were co-transfected with 250 ng of luciferase reporter plasmid pGL3-IFN $\beta$ , 500 ng of pcDNA3 or FLAG-TRAF3 plasmid and 375 ng of indicated plasmids. At 24h post-transfection, cells were left uninfected or infected with SeV (200 HAU/ml) for 16h and relative luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. Mean values  $\pm$  S.D. of triplicate determinations are shown (\*\*  $P < 0.01$ ). One of three independent experiments with similar results is shown

**Figure 9.** Requirement of Sec16A and p115 for optimal type I IFN innate immune response in cells exposed to cytosolic DNA and RNA sensor ligands. **(A-D)** HeLa cells were transfected with nonsilencing (Ns) RNA duplexes or two different sets of

siRNA duplexes that specifically target p115 or Sec16A as indicated. 72h post-transfection, cells were left untreated (Ctl) or stimulated with poly I:C (2.5  $\mu$ g/ml), poly dA:dT (1  $\mu$ g/ml) or SeV (200 HAU/ml) for 6h to 8h. RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR using primers for *ifn $\beta$* , *ifit1*, *oas1*. Data are means +/- S.D. (n=3). \* Significantly below the induction response; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. **(B and D)** Cellular extracts were also prepared and subjected to immunoblot analysis using indicated antibodies. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure 10.** p115 and Sec16A are required for optimal IRF-3 activation in response to activation of cytosolic RNA and DNA sensors. HeLa cells were infected with lentiviral vectors encoding shRNA targeting p115 **(A)** or Sec16A **(B)** and non-targeting (NT) control shRNA for 24h followed by puromycin selection (1.5  $\mu$ g/ml) for 5 days. Cells were left untreated or stimulated with poly I:C (1  $\mu$ g/ml), poly dA:dT (1  $\mu$ g/ml) or SeV (200 HAU/ml) for 16h. Whole-cell lysates were prepared and subjected to immunoblot analysis with indicated antibodies. One of two independent experiments with similar results is shown.

**Figure 11.** Through its ability to interact and colocalize with components of the ERES (Sec16A, depicted as thick green lines), ERGIC (ERGIC53 and p115) and the cis-Golgi apparatus (p115 and GM130), a subpopulation of TRAF3 (red circles) resides in the ER-to-Golgi vesicular compartment in non-infected cells. Upon dsRNA and dsDNA sensing, the cis-Golgi disorganizes into punctate structures, giving rise to membrane-bound compartments composed of at least GM130 and TRAF3 (dashed line). We propose that these membrane-bound compartments allow the proper positioning of TRAF3 with MAVS at Mitochondrial-Associated endoplasmic reticulum Membranes (MAM) [86]. There, being in close proximity with a component of the exocyst (sec5) and the translocon (Sec61 $\beta$ ), TRAF3 allows the activation of TBK1 and IRF3 leading to activation of the type I IFN response. A similar scenario was recently proposed for STING (yellow circles) where in response to DNA virus

infection, it traffics from the ER to the cis-Golgi apparatus and finally to a distinct perinuclear region for the activation of TBK1[61,62]. MTOC: microtubule-organizing center.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Figure S1.** The TRAF3 interactome network. **(A)** AP-MS data with  $\geq 0.5$  AvgP SAINT value. Indicated baits and prey (HUGO gene names; USO1 is the gene name for p115) are listed, alongside the accession number (protein NCBI gi) for the prey, and SAINT output data. Columns are as follows (« | » is a delimiter for biological replicates): « IP » are unique identifiers for the experiment in the ProHits database; « Spec » are the spectral counts in each individual experiment; « SpecSum » is the sum of the spectral counts across all analyses. « iProb » is the initial probability in an individual experiment; « ctrlCounts » are the spectral counts in five virtual controls, as defined in Methods; « AvgP » is the average of the individual probabilities. The following proteins passed the SAINT threshold filter but were excluded from further analysis, based on high-frequency of detection in FLAG AP/MS analysis from HEK293 cells: EWSR1, FUS, HNRNPC, TUBB2C, HSPA9, HNRNPM, HNRNPH1, ABCA13 and CEP290. **(B)** Overlay of the filtered mass spectrometry data with literature-curated interactions (as reported in BioGRID version 3.1.76\*). Data is visualized in Cytoscape\*\*. The blue colored edges are from the mass spectrometry data in Figure S1A; the grey from literature-curated interactions. The thickness of the blue edges corresponds to the number of spectral counts for each of the proteins. Dashed lines on the BioGRID data are for “yeast two hybrid”, “colocalization” or “enzymatic activity” annotations in BioGRID; continuous lines are for co-IP coupled to mass spectrometry or to immunoblotting, as well as for co-crystal structures. The two baits, TRAF3 and USO1/p115 are shown as larger nodes. The previously known TRAF3 interactor is shown in pink. New TRAF3 interactors USO1/p115 and SEC16A are shown in orange. \* Stark C, Breitkreutz BJ, Chatr-Aryamontri A, Boucher L, Oughtred R, Livstone MS, Nixon J, Van Auken K, Wang X, Shi X, Reguly T, Rust JM, Winter A, Dolinski K, Tyers M. (2010) The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* 39: D698-704; \*\*Shannon, P. et al. (2003) Cytoscape: a

software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504. **(C-D)** Co-immunoprecipitation experiments showing the association of FLAG-TRAF3, but not TRAF2 or TRAF6, with Myc-p115 or EGFP-Sec16A immunocomplexes

**Figure S2.** Selective colocalization of TRAF3 with components of the ER-to-Golgi vesicular pathway. **(A)** Confocal microscopy analysis of HeLa cells transfected with FLAG-tagged TRAF2 (panel 1), TRAF3 (panel 2) or TRAF6 (panel 3). The Golgi apparatus was labeled with an anti-GM130 antibody. **(B)** Colocalization of FLAG-TRAF2 (panel 1), FLAG-TRAF3 (panel 2) or FLAG-TRAF6 (panel 3) with endogenous Sec16A. **(C)** Colocalization of FLAG-TRAF2 (panel 1), FLAG-TRAF3 (panel 2) or FLAG-TRAF6 (panel 3) with Myc-p115.

**Figure S3.** Microtubule depolarization affects the perinuclear localization of TRAF3. HeLa cells were transfected with FLAG-TRAF3 (panels 1, 2 and 4) or FLAG-TRAF3 and Myc-p115 (panels 3 and 5) and treated with dimethylsulfoxide (panel 1), 5  $\mu\text{g/ml}$  of nocodazole for 2h at 37°C (panels 2 and 3) or 5  $\mu\text{g/ml}$  of BFA for 1h at 37°C (panels 4 and 5) before confocal microscopy analyses. Bars represent 10  $\mu\text{m}$ . One of two independent experiments with similar results is shown.

**Figure S4.** Silencing of Sec16A and p115 disrupts TRAF3 localization. **(A)** HeLa cells were transfected with 40 nM nonsilencing RNA duplexes (panels 1 and 3) or 40 nM siRNA duplexes that specifically target Sec16A (panels 2 and 4). At 72h post-transfection, the cells were stained for endogenous GM130, Sec16A, TRAF3, and the nucleus (DAPI). Arrows in panel 2 indicate the silencing effects of the Sec16A siRNA duplexes on the expression pattern of Sec16A and the cellular distribution of GM130. Arrows in panel 4 demonstrate that in the absence of Sec16A, TRAF3 no longer colocalizes with the cis-Golgi marker GM130. Bars represent 5  $\mu\text{m}$ . **(B)** HeLa cells were transfected with 40 nM nonsilencing RNA duplexes (panel 1) or 40 nM siRNA duplexes that specifically targets p115 (panel 2). At 72h post-transfection, the cells were stained for endogenous TRAF3, p115, and the nucleus (DAPI). The arrows

indicate the silencing effect of the p115 siRNA duplexes on the expression pattern of p115 and the cellular distribution of TRAF3. Bars represent 5  $\mu$ m. One of three independent experiments with similar results is shown.

**Figure S5.** COPI/COPII-vesicular retention of the TRAF3-AKKFF mutant affects its extraction efficiency as well as interaction with MAVS. 293T cells were co-transfected with Myc-MAVS and the indicated FLAG-TRAF3 constructs (wtTRAF3 or TRAF3-AKKFF). 24h post-transfection, whole cell extracts were prepared using 1% Triton X-100 or RIPA lysis buffers as indicated. Cellular extracts were then subjected to immunoprecipitation using anti-FLAG antibodies or used in Western blot analysis (Input). Following multiples washing steps, immunoprecipitated proteins were then subjected to Western blot analysis using the indicated antibodies. Interestingly, using a soft lysis condition (1% Triton X-100), we were not able to extract the same amount of the two TRAF3 populations in the IP and in the INPUT (left panels), most likely due to the ability of the TRAF3-AKKFF mutant to be retained in the rich vesicular COPI/COPII environment. On the other hand, the use of a RIPA buffer helped the extraction of the TRAF3-AKKFF mutant from its vesicular-rich environment (right panels). However under these conditions, we might have disrupted the COPI/COPII vesicles, releasing the TRAF3-AKKFF mutant into the cell lysate and allowing its interaction with MAVS. Nonetheless, a lower amount of the TRAF3-AKKFF mutant was detected in the Myc-MAVS immunocomplex compared to wtTRAF3 (right panels).

**Figure S6.** Mild expression of Sec16A and p115 in Hec1B cells increases activation of ISG56 and NF- $\kappa$ B promoter. **(A-C)** Hec1B cells were co-transfected with pGL3-ISG56-luciferase reporter gene, 125 ng of empty vector, Myc-p115 or Sec16A and 15 ng of His-TRIF **(A)**, 15 ng of FLAG-MAVS **(B)** or 100 ng of FLAG-TBK1 **(C)**. **(D-F)** Hec1B cells were co-transfected with pGL3-NF- $\kappa$ B-luciferase reporter gene together with 125 ng of empty vector, Myc-p115 or Sec16A and 60 ng of His-TRIF **(D)**, 60 ng of FLAG-MAVS **(E)** or 200 ng of FLAG-TBK1 **(F)**. Data represent the fold-activation over the corresponding vector control. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of

triplicate determinations. The data are representative of at least four different experiments with similar results.

**Figure S7.** Overexpression of p115 or Sec16A in highly transfectable cell lines inhibited TRAF3-dependent transcriptional activation as depletion of Sec16A or p115. **(A-C)** 293T cells were co-transfected with pGL3-IFN $\beta$  luciferase reporter gene, plus increasing amounts of indicated plasmids along with 15 ng of His-TRIF **(A)**, 15 ng of FLAG- $\Delta$ RIGI **(B)** or 15 ng of FLAG-MAVS **(C)**. **(D)** 293T cells were co-transfected with pGL3-IFN $\beta$  luciferase reporter gene, increasing amount of FLAG-TRAF3, 15 ng of FLAG-MAVS or empty vector and 70 ng of Myc-p115 or EGFP-Sec16A **(D)**. **(E-F)** 293T cells were co-transfected with pGL3-ISRE luciferase reporter gene plus increasing amounts of indicated plasmids along with 100 ng of FLAG-TBK1 **(E)** or 15 ng of FLAG-IRF3 5D **(F)**. Relative luciferase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are representative of at least four different experiments with similar results.

**FIGURE 1**

**A**

Sample #1 TRAF3	MS	TP	UP
p115	235	5	5
Sec16A	144	4	4
TBK1	203	5	5

Sample #2 TRAF3	MS	TP	UP
p115	81	4	2
Sec16A	88	5	3
TBK1	86	4	3

**B**

Flag-TRAF3	-	+	-	+
Myc-p115	-	-	+	+
IP: $\alpha$ -Flag WB: $\alpha$ -Myc				p115
IP: $\alpha$ -Flag WB: $\alpha$ -Flag				TRAF3
5% input WB: $\alpha$ -Myc				p115
5% input WB: $\alpha$ -Flag				TRAF3

**C**

EGFP-Sec16A	-	+	+
Flag-TRAF3	+	-	+
IP: $\alpha$ -GFP WB: $\alpha$ -Flag			TRAF3
			IgG(H)
IP: $\alpha$ -GFP WB: $\alpha$ -GFP			Sec16A
5% input WB: $\alpha$ -Flag			TRAF3
5% input WB: $\alpha$ -GFP			Sec16A

**D**

Sample #1 p115	MS	TP	UP
Sec16A	967	33	22
GM130	1938	97	36

Sample #2 p115	MS	TP	UP
Sec16A	479	17	8
GM130	1519	57	23

**E**

EGFP-Sec16A	-	+	-	+
Flag-TRAF3	-	-	+	+
Myc-p115	-	-	+	+
IP: $\alpha$ -GFP WB: $\alpha$ -Myc				p115 N/S
IP: $\alpha$ -GFP WB: $\alpha$ -GFP				Sec16A
5% input WB: $\alpha$ -Myc				p115
5% input WB: $\alpha$ -GFP				Sec16A

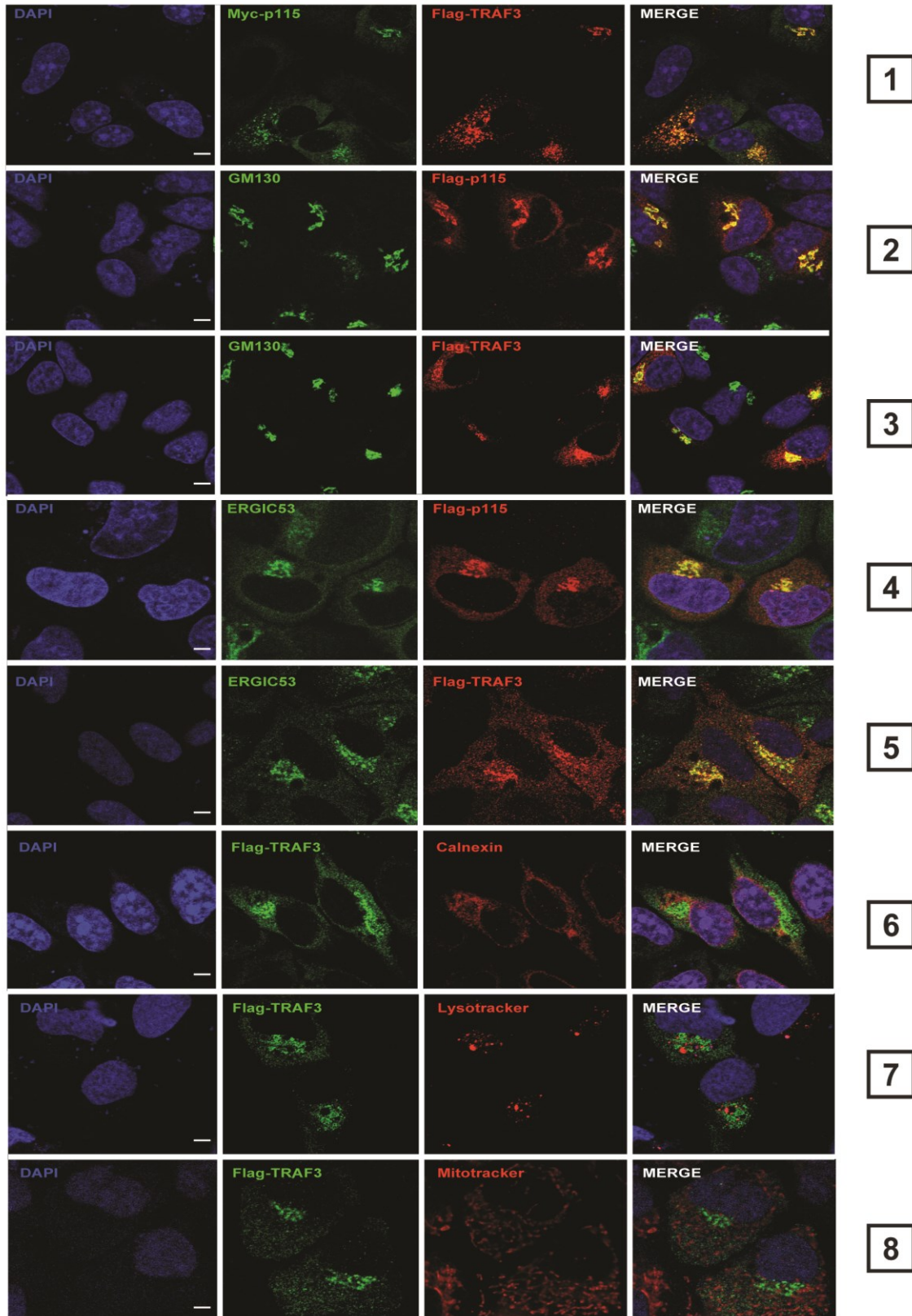
**F**

Flag-p115	+	-	+
Myc-TRAF3	-	+	+
IP: $\alpha$ -Flag WB: $\alpha$ -Myc			TRAF3
			IgG(H)
IP: $\alpha$ -Flag WB: $\alpha$ -Flag			p115
5% input WB: $\alpha$ -Myc			TRAF3
5% input WB: $\alpha$ -Flag			p115

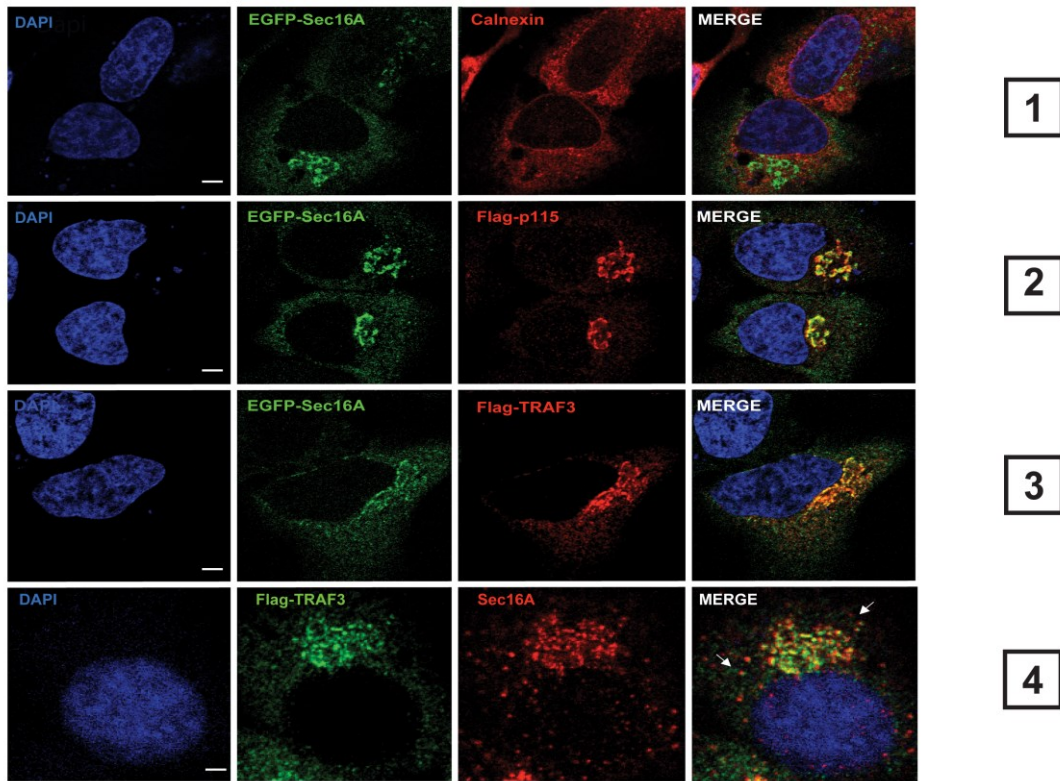


FIGURE 2

A



**B**



**C**

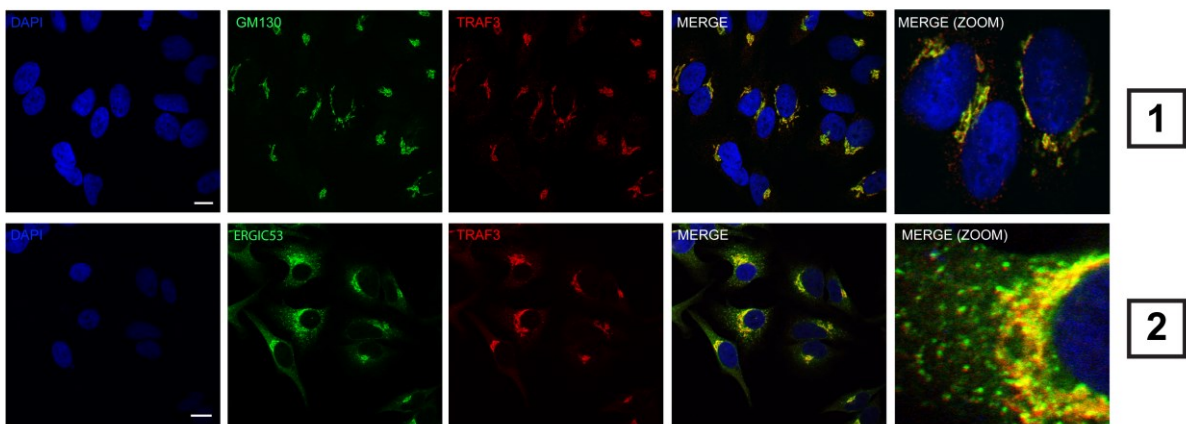
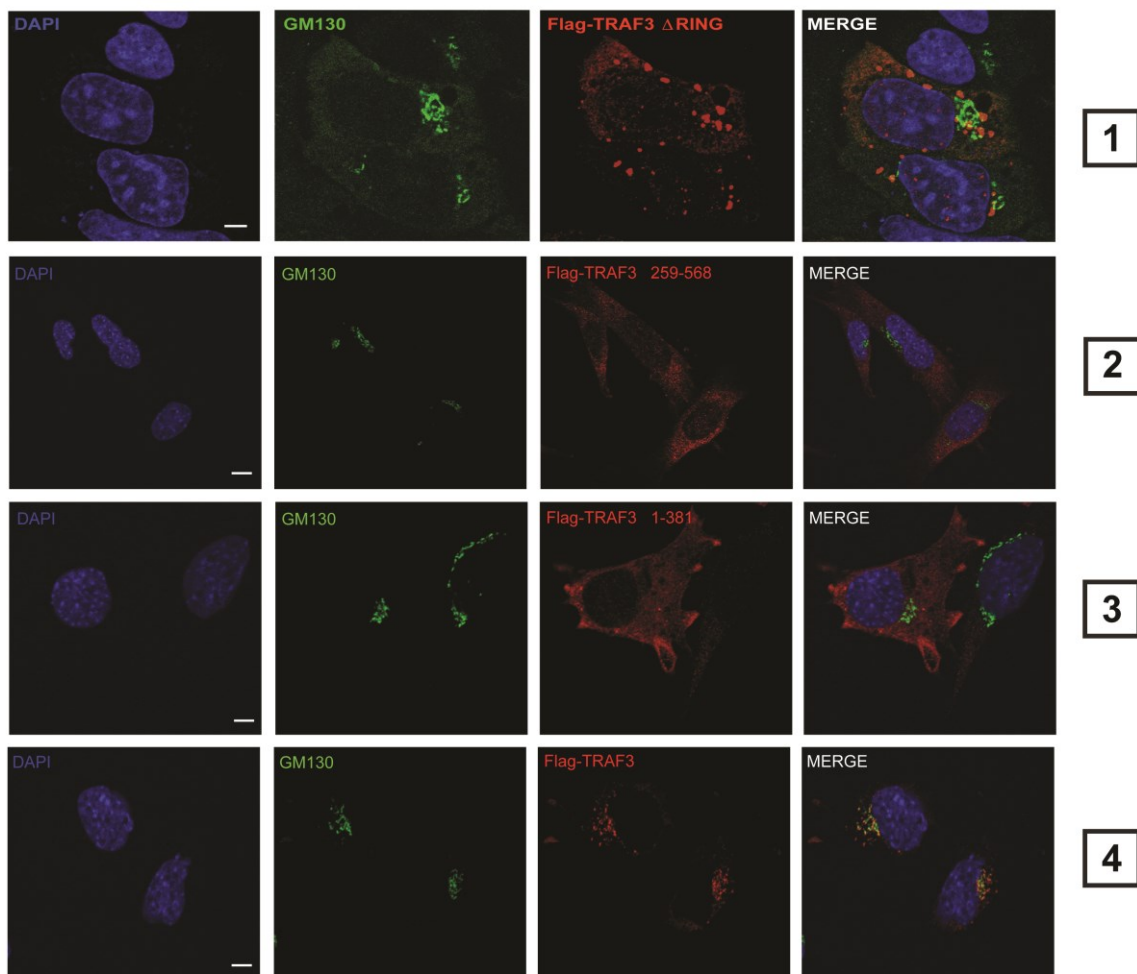
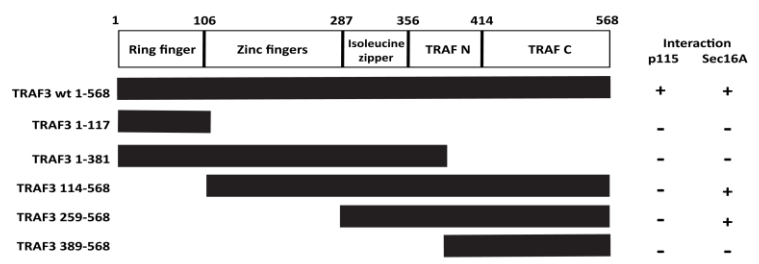
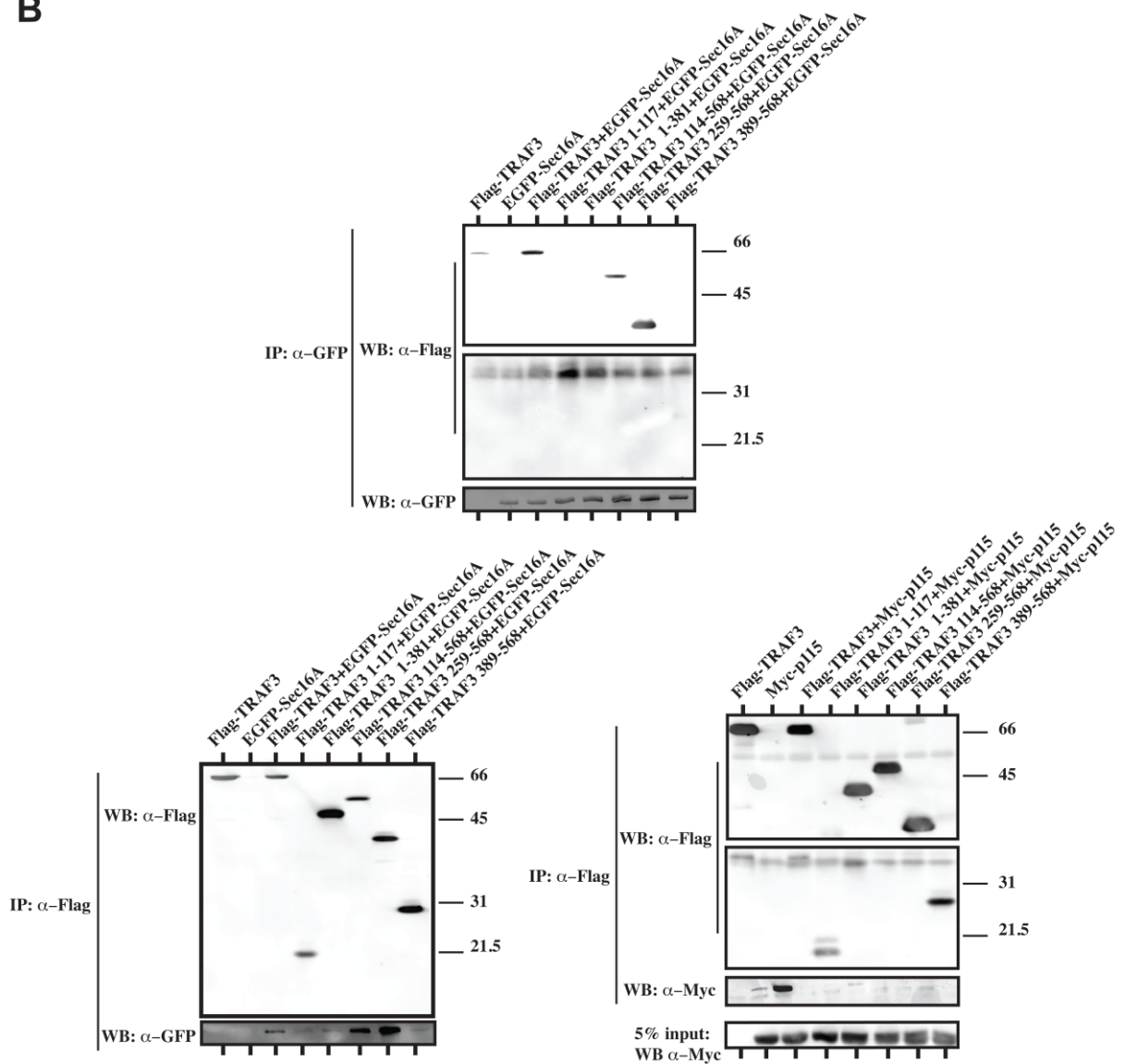


FIGURE 3

A



**B**



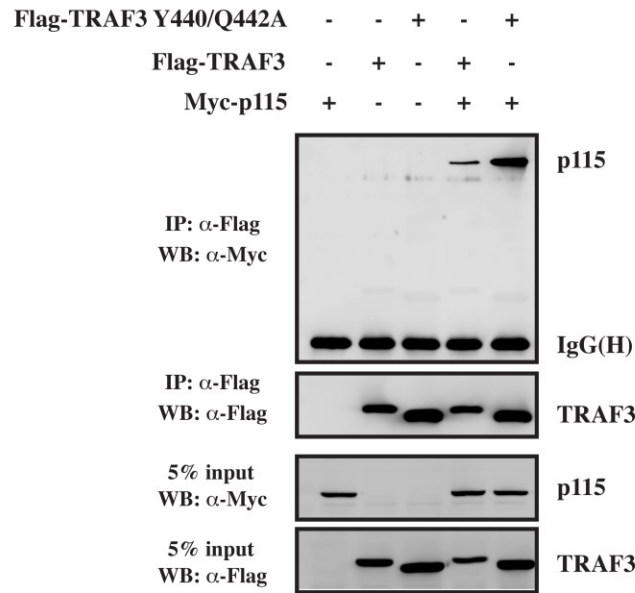
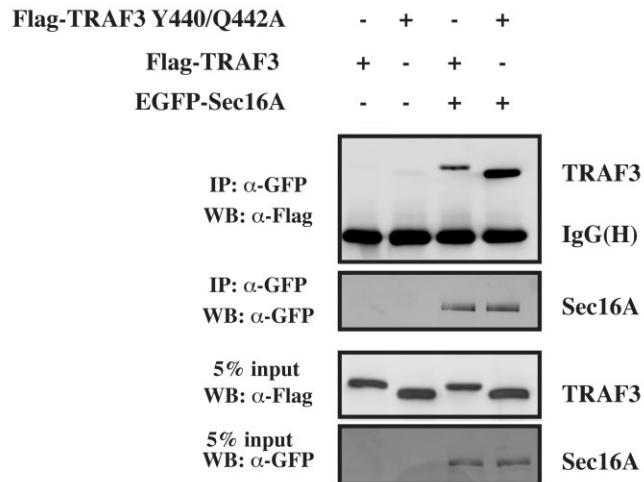
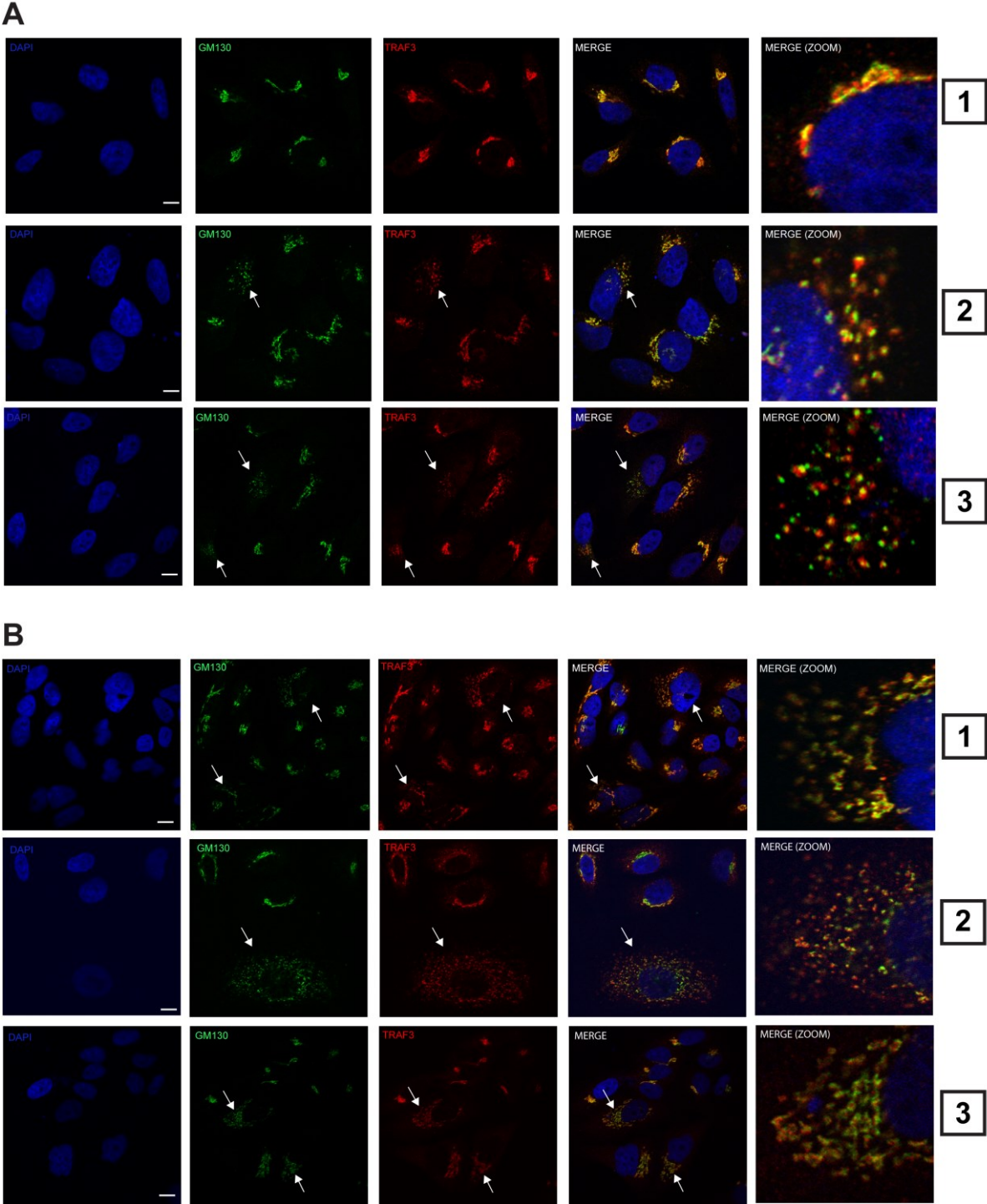
**C****D**

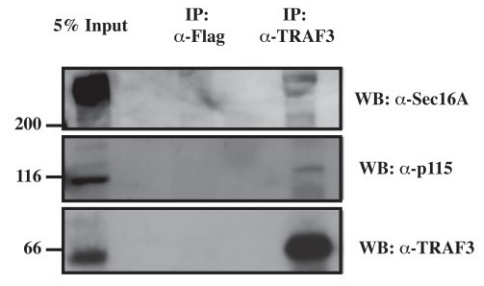


FIGURE 4



**FIGURE 5**

**A**



**B**

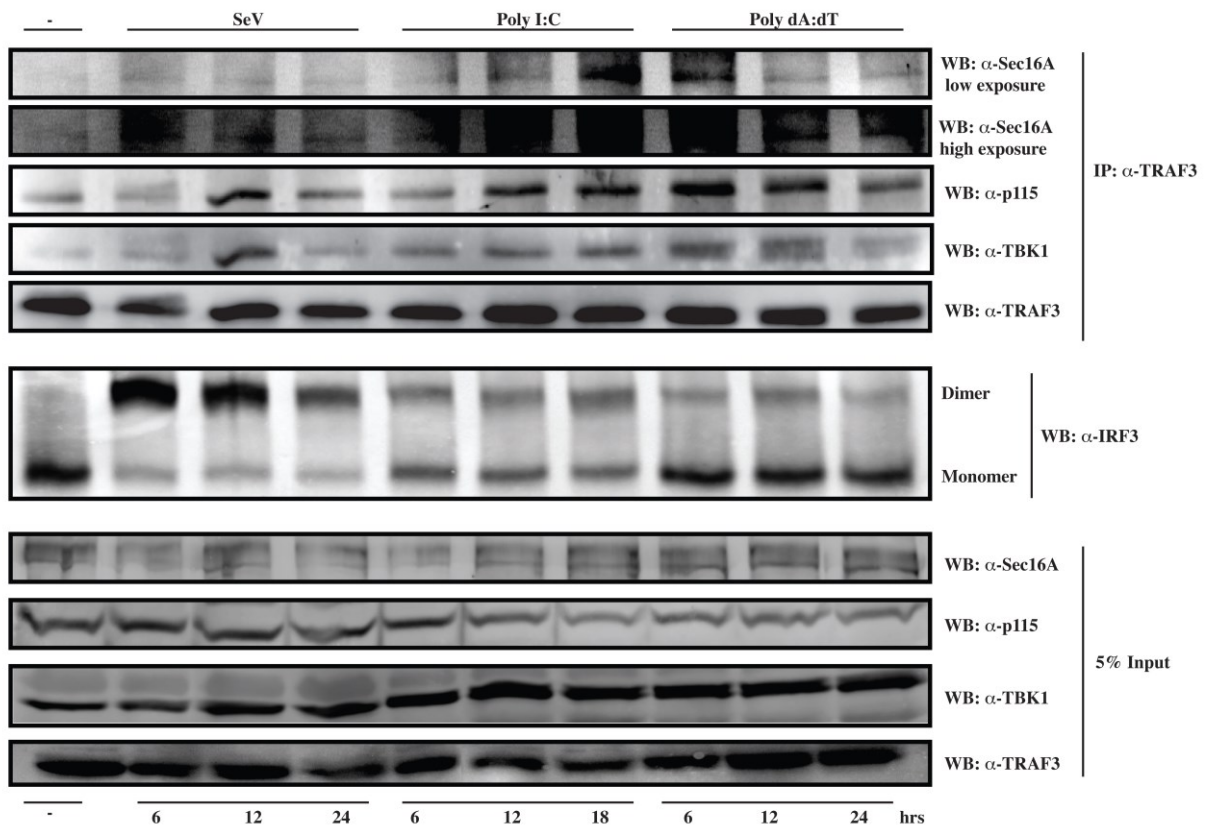
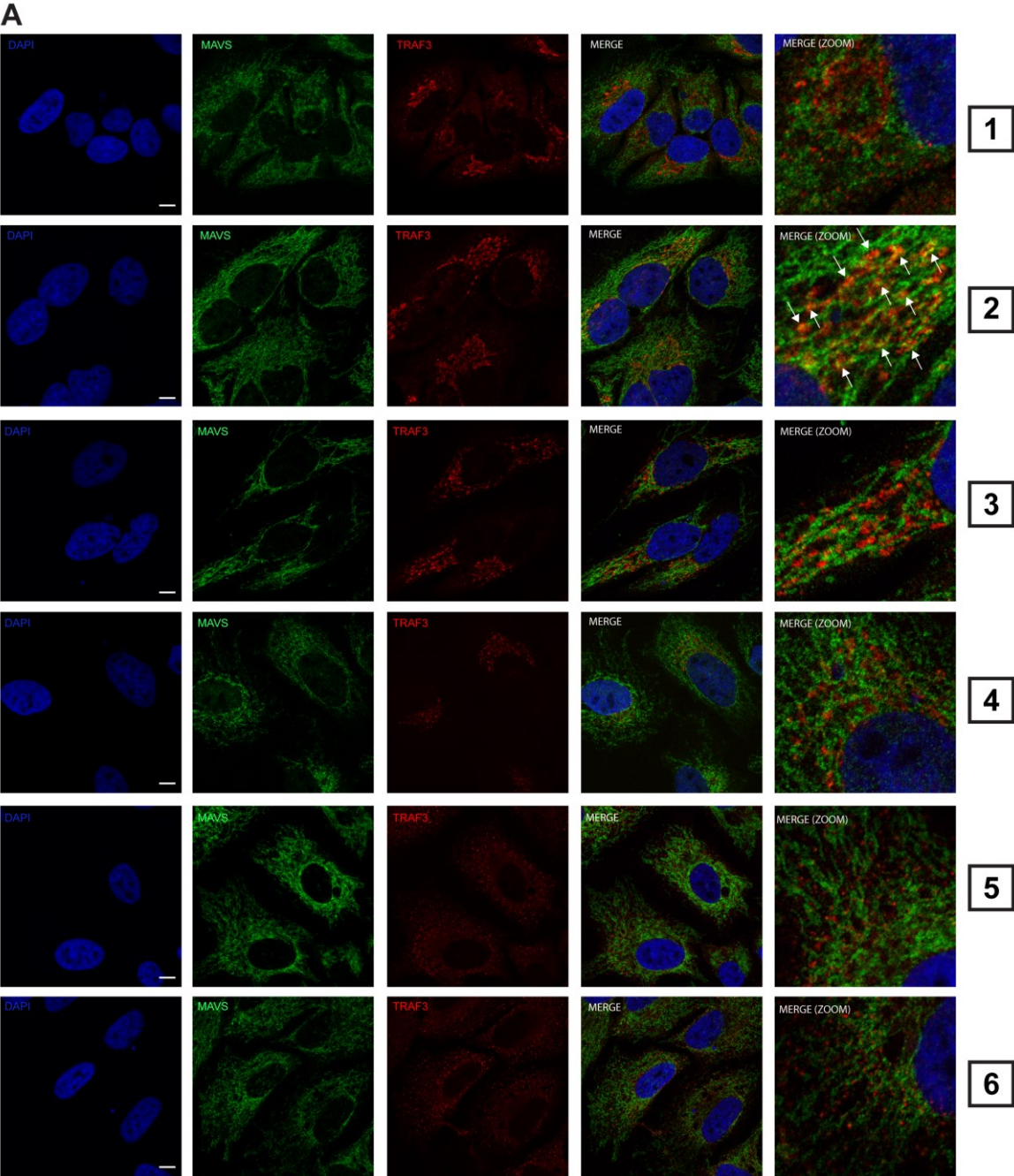
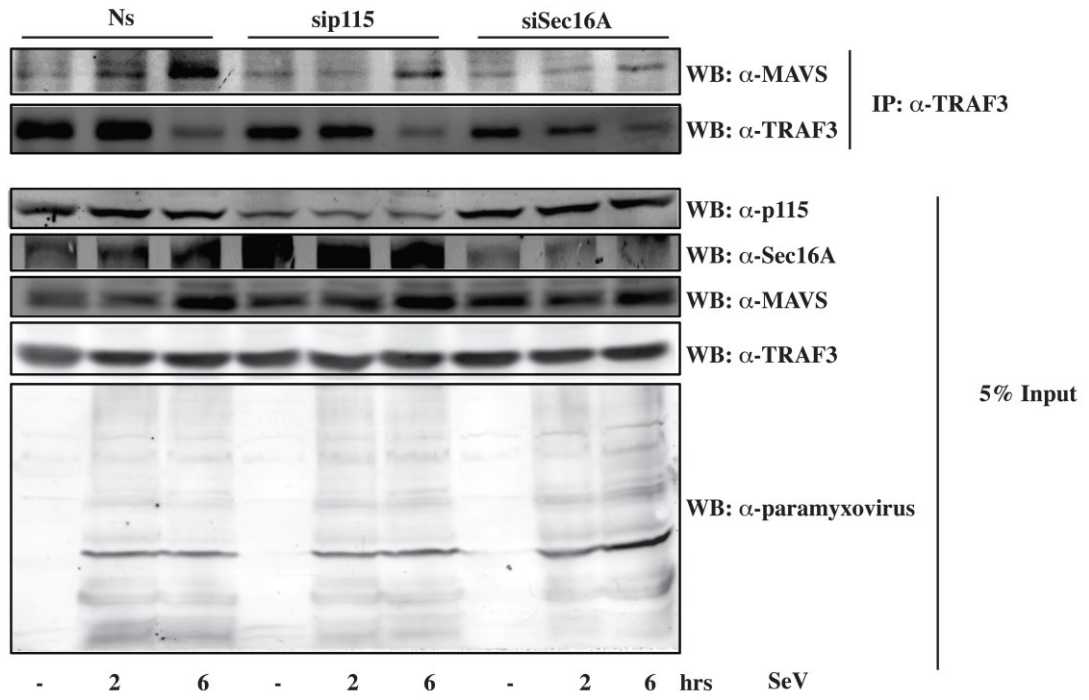
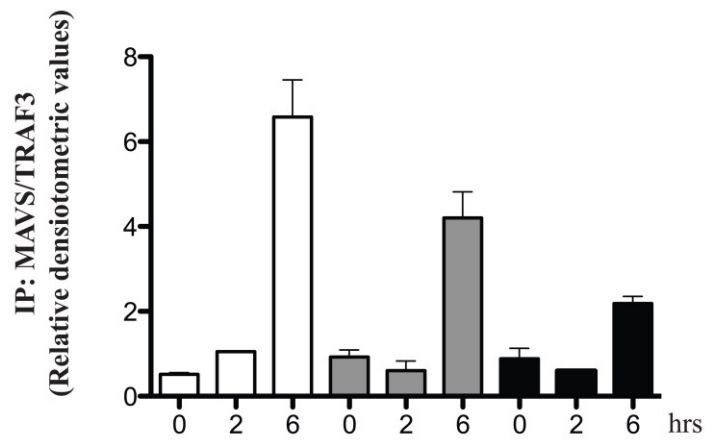


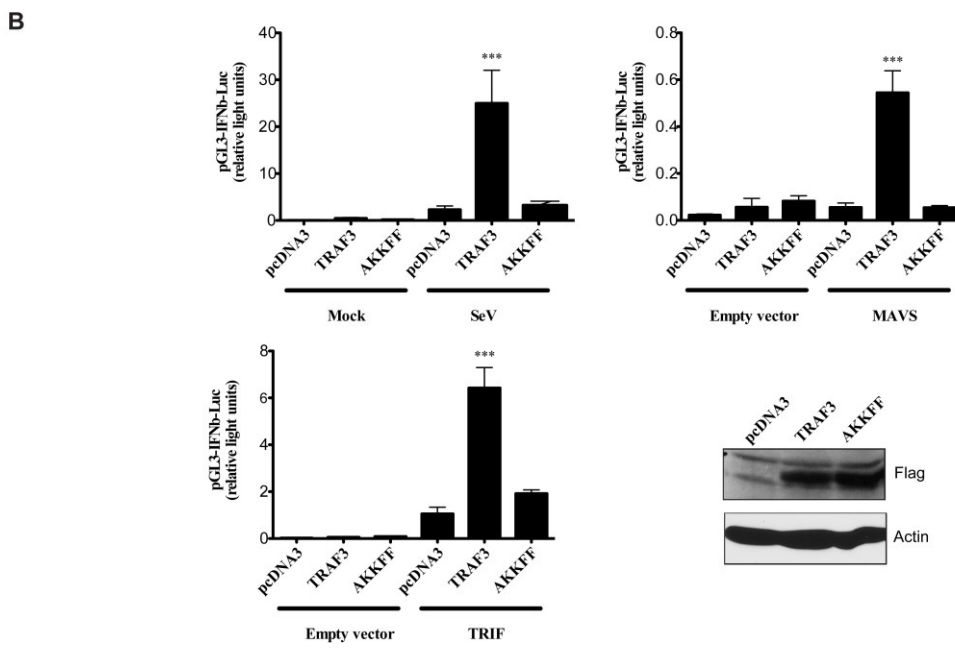
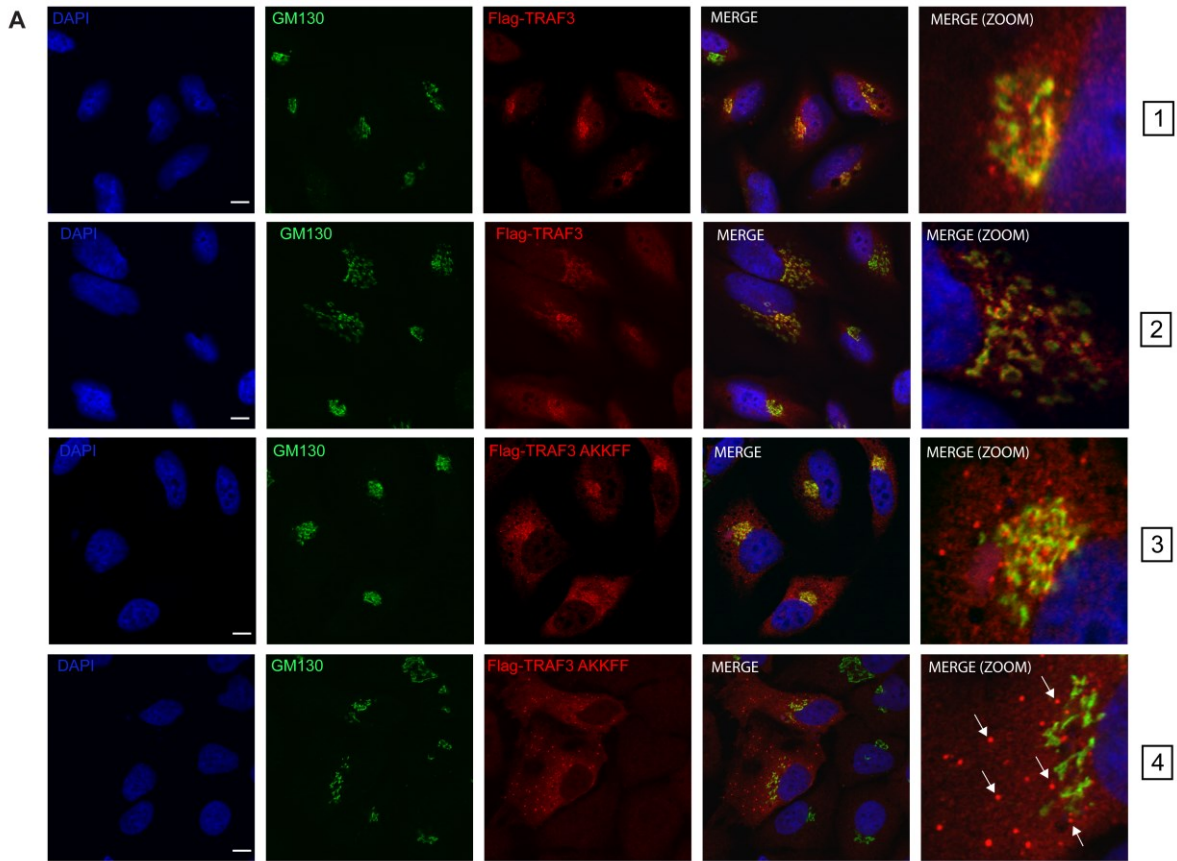
FIGURE 6



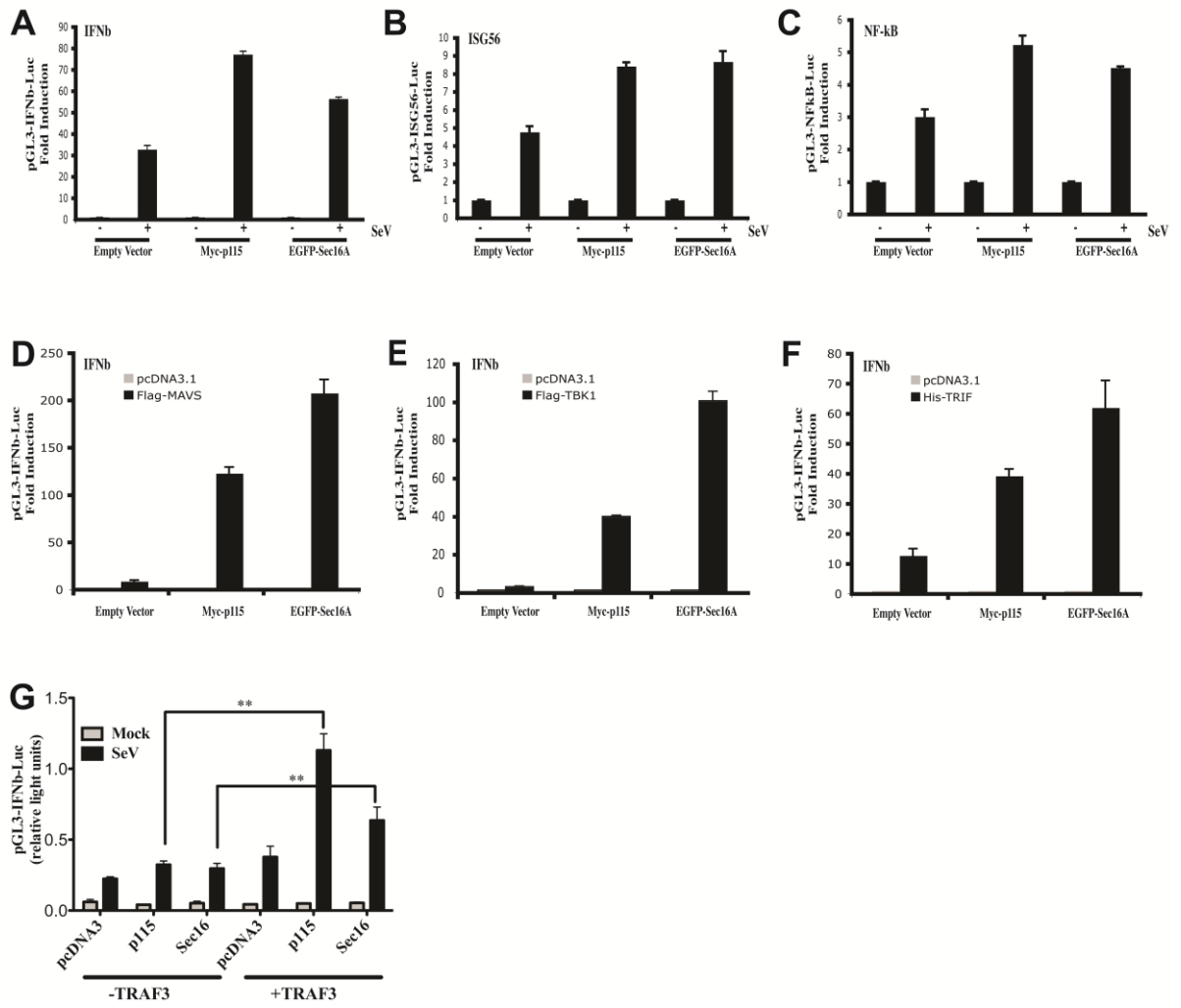


**B****C**

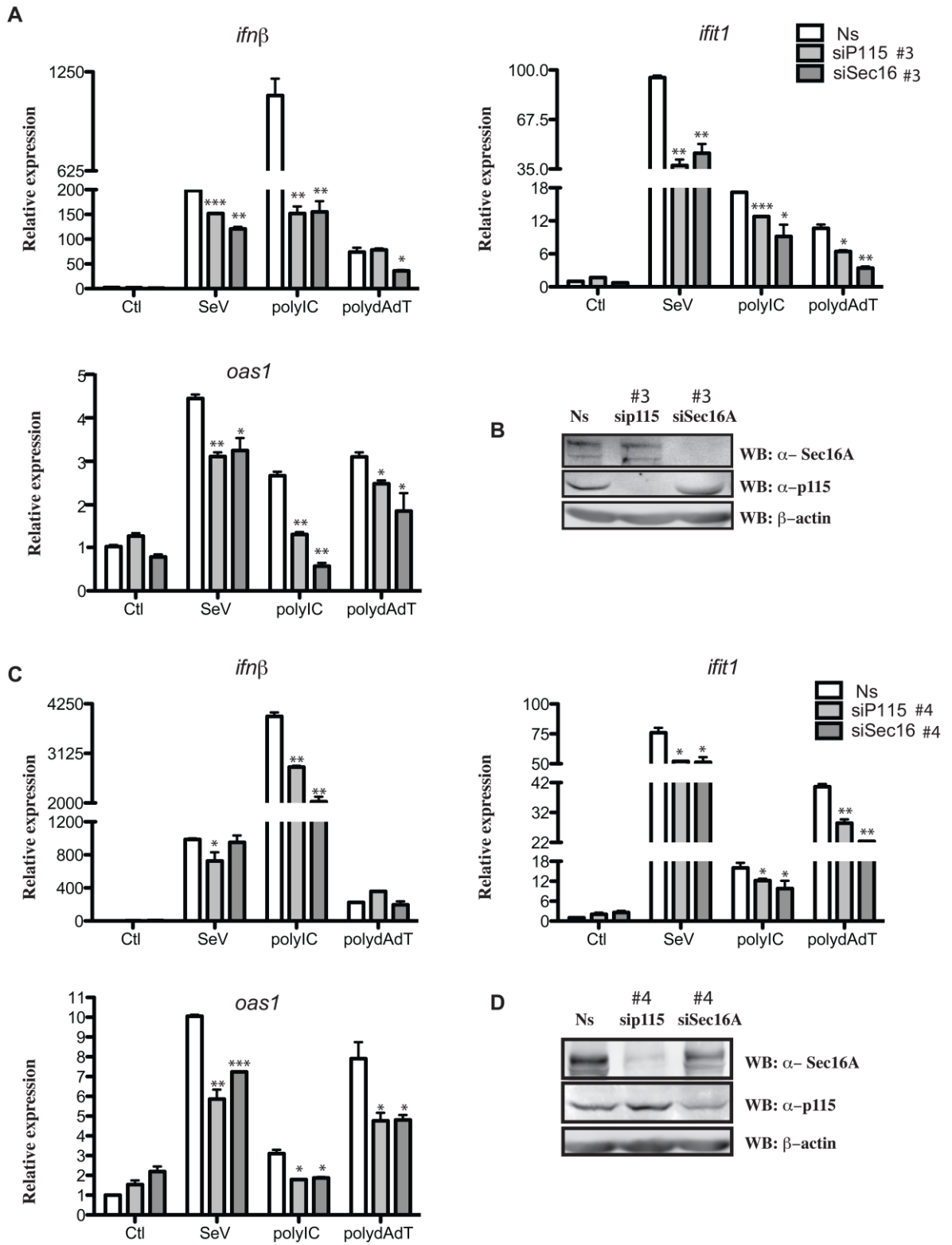
**FIGURE 7**



**FIGURE 8**



**FIGURE 9**



**FIGURE 10**

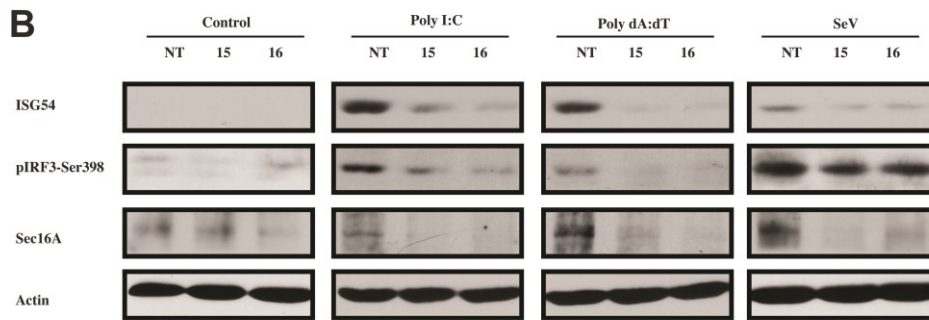
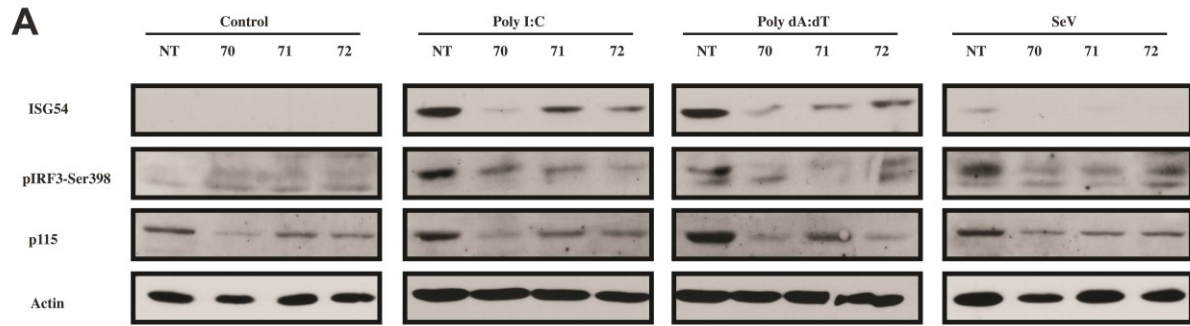
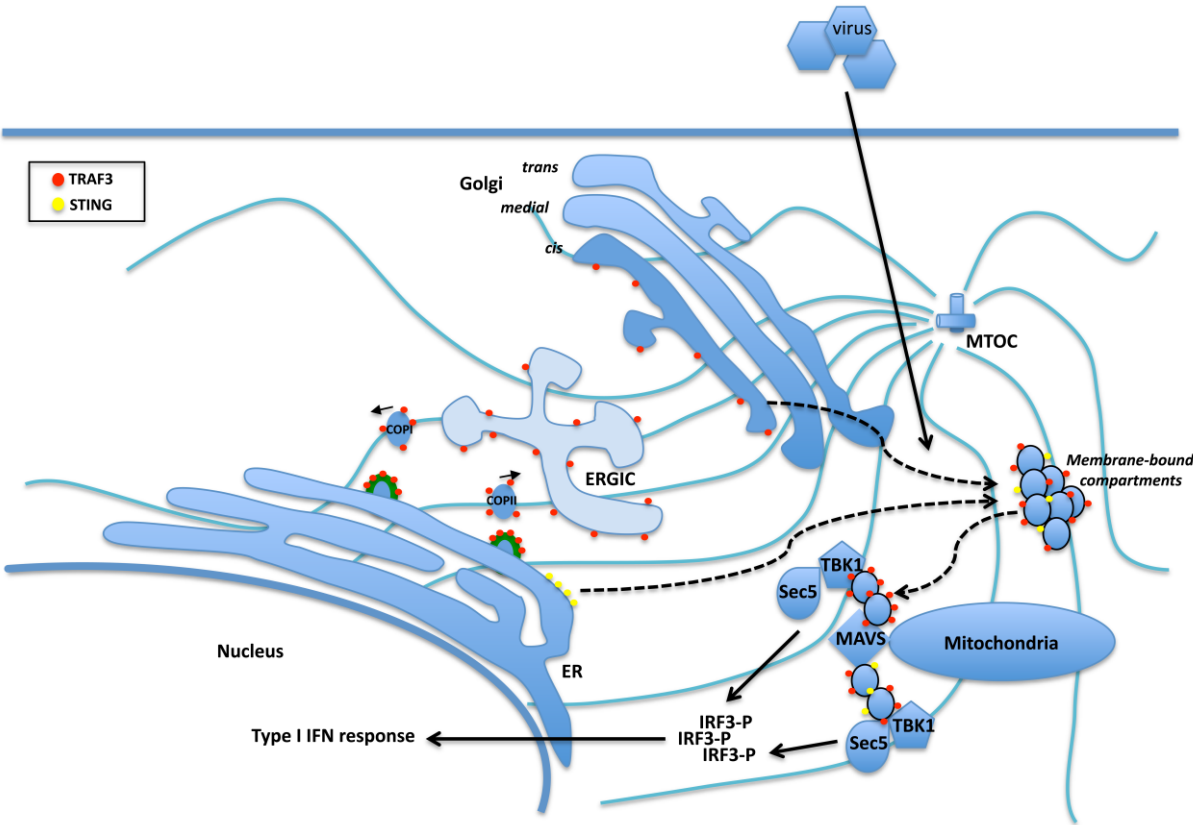


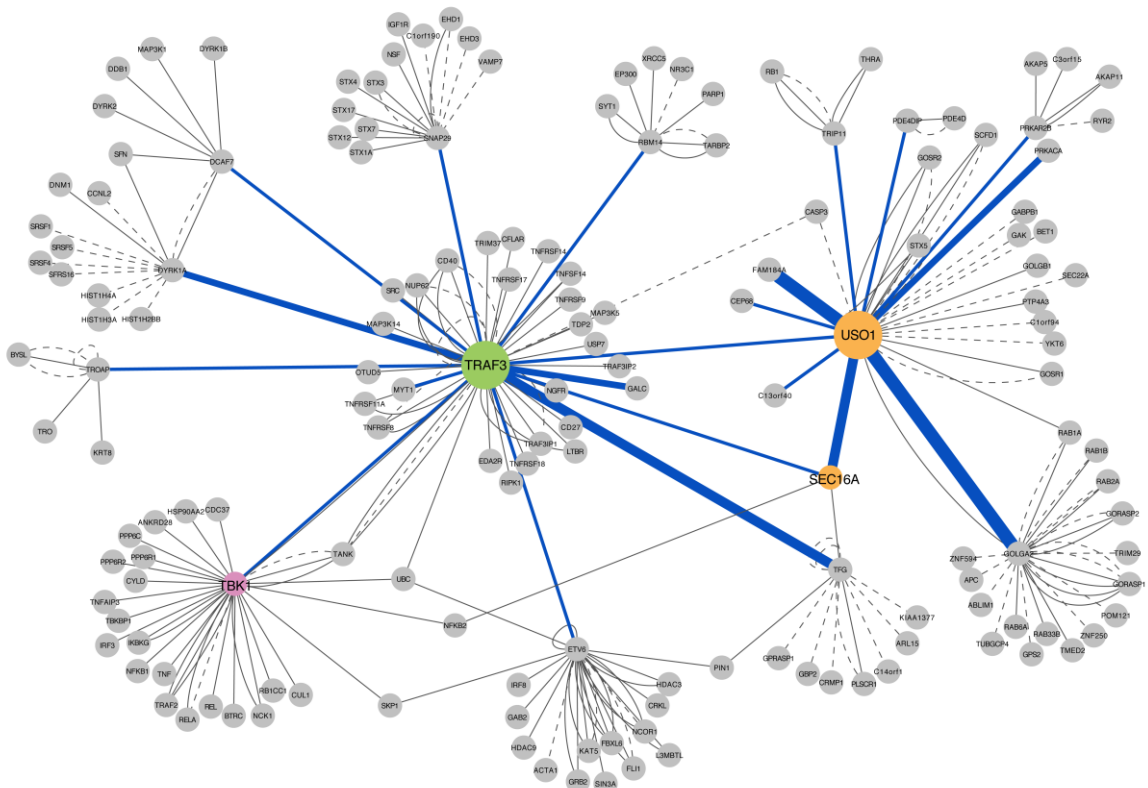
FIGURE 11



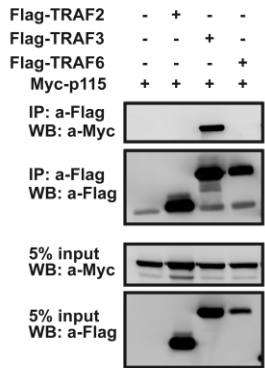
**A**

Bait	Prey	Prey Accession	IP	Spec	SpecSum	iProb	ctrlCounts	AvgP
TRAF3	SNAP29	4759154	36_4800 36_5100	4 4	8	0.99 0.99	0 0 0 0 0	0,993
TRAF3	TFG	21361320	36_4800 36_5100	32 53	85	0.99 0.97	0 0 0 0 0	0,981
TRAF3	SEC16A	124378039	36_4800 36_5100	4 5	9	0.88 0.98	0 0 0 0 0	0,929
TRAF3	USO1	4505541	36_4800 36_5100	5 4	9	0.86 0.87	6 0 0 0 0	0,864
TRAF3	RBM14	5454064	36_4800 36_5100	5 11	16	1.00 0.99	0 0 0 0 0	0,994
TRAF3	DCAF7	108936958	36_4800 36_5100	9 7	16	1.00 1.00	0 0 0 0 0	0,999
TRAF3	GALC	83281450	36_4800 36_5100	12 16	28	1.00 1.00	0 0 0 0 0	0,999
TRAF3	DYRK1A	18765752	36_4800 36_5100	18 15	33	1.00 1.00	0 0 0 0 0	0,996
TRAF3	TBK1	7019547	36_4800 36_5100	5 4	9	0.99 1.00	0 0 0 0 0	0,996
TRAF3	ETV6	4503611	36_4800 36_5100	6 7	13	0.99 1.00	0 0 0 0 0	0,995
TRAF3	TROAP	154800453	36_4800 36_5100	4 2	6	0.99 0.99	0 0 0 0 0	0,993
TRAF3	MYT1	17975763	36_4800 36_5100	3 14	17	0.97 0.99	0 0 0 0 0	0,979
USO1	PDE4DIP	50658071	36_6611 36_6186	12 4	16	0.99 0.98	0 0 0 0 0	0,986
USO1	SEC16A	124378039	36_6611 36_6186	21 44	65	1.00 0.93	0 0 0 0 0	0,964
USO1	PRKACA	4506055	36_6611 36_6186	8 20	28	0.93 0.98	3 2 0 0 0	0,957
USO1	C13orf40	226246554	36_6611 36_6186	13 6	19	0.77 0.49	5 3 0 0 0	0,629
USO1	TRIP11	190194412	36_6611 36_6186	9 10	19	0.97 0.97	3 0 0 0 0	0,968
USO1	PRKAR2B	47132585	36_6611 36_6186	12 12	24	1.00 1.00	0 0 0 0 0	0,998
USO1	CEP68	154800457	36_6611 36_6186	5 10	15	0.99 1.00	0 0 0 0 0	0,996
USO1	FAM184A	154350244	36_6611 36_6186	48 75	123	0.99 0.99	0 0 0 0 0	0,989
USO1	GOLGA2	194097392	36_6611 36_6186	70 116	186	0.07 1.00	78 0 0 0 0	0,533

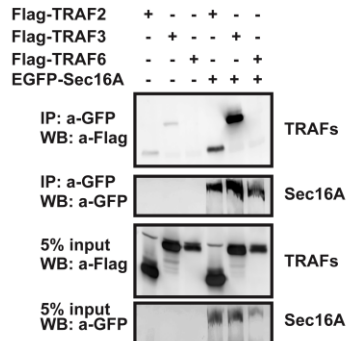
**B**



**C**

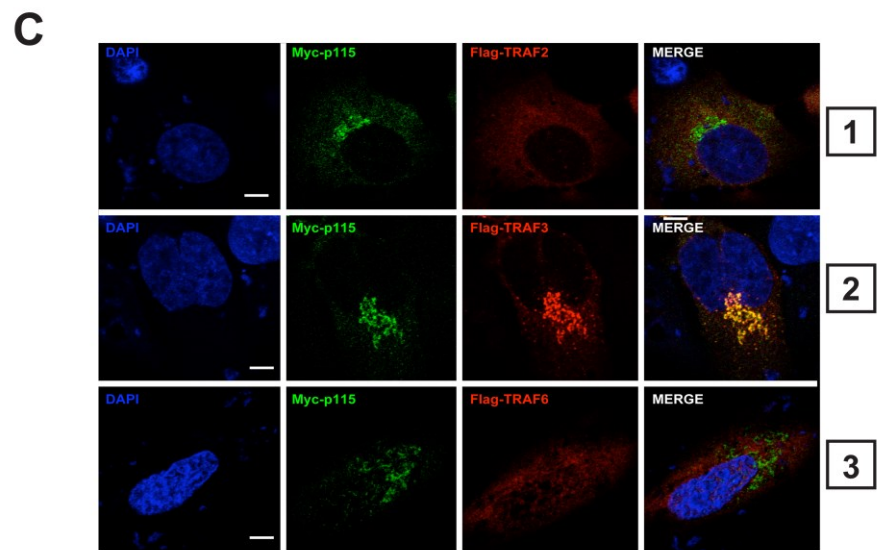
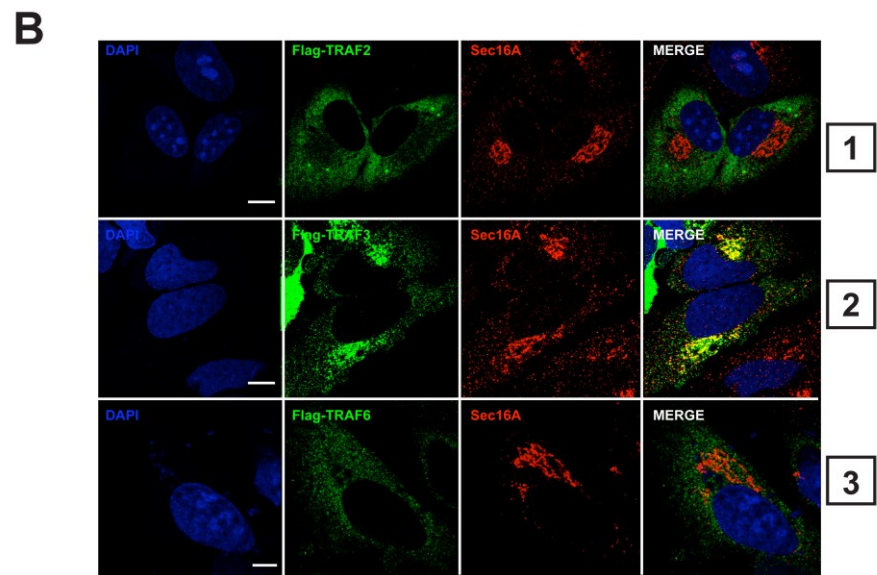
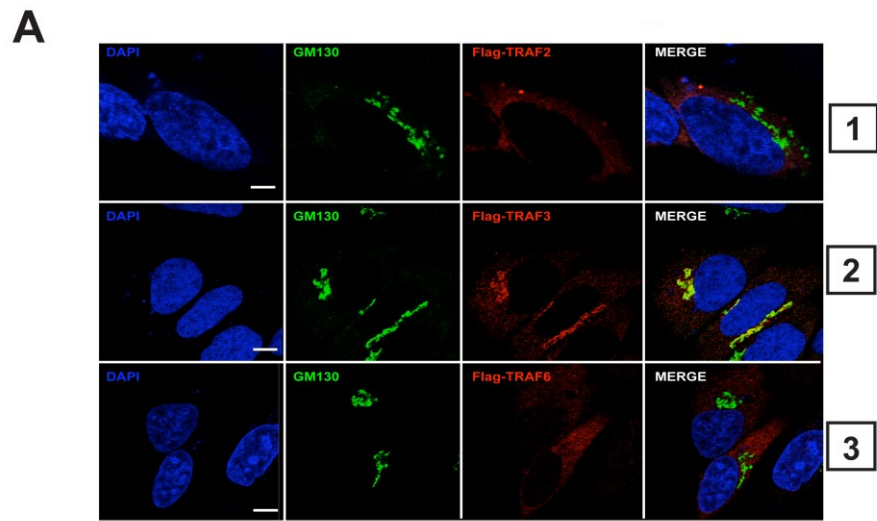


**D**



**FIGURE S1**





**FIGURE S2**



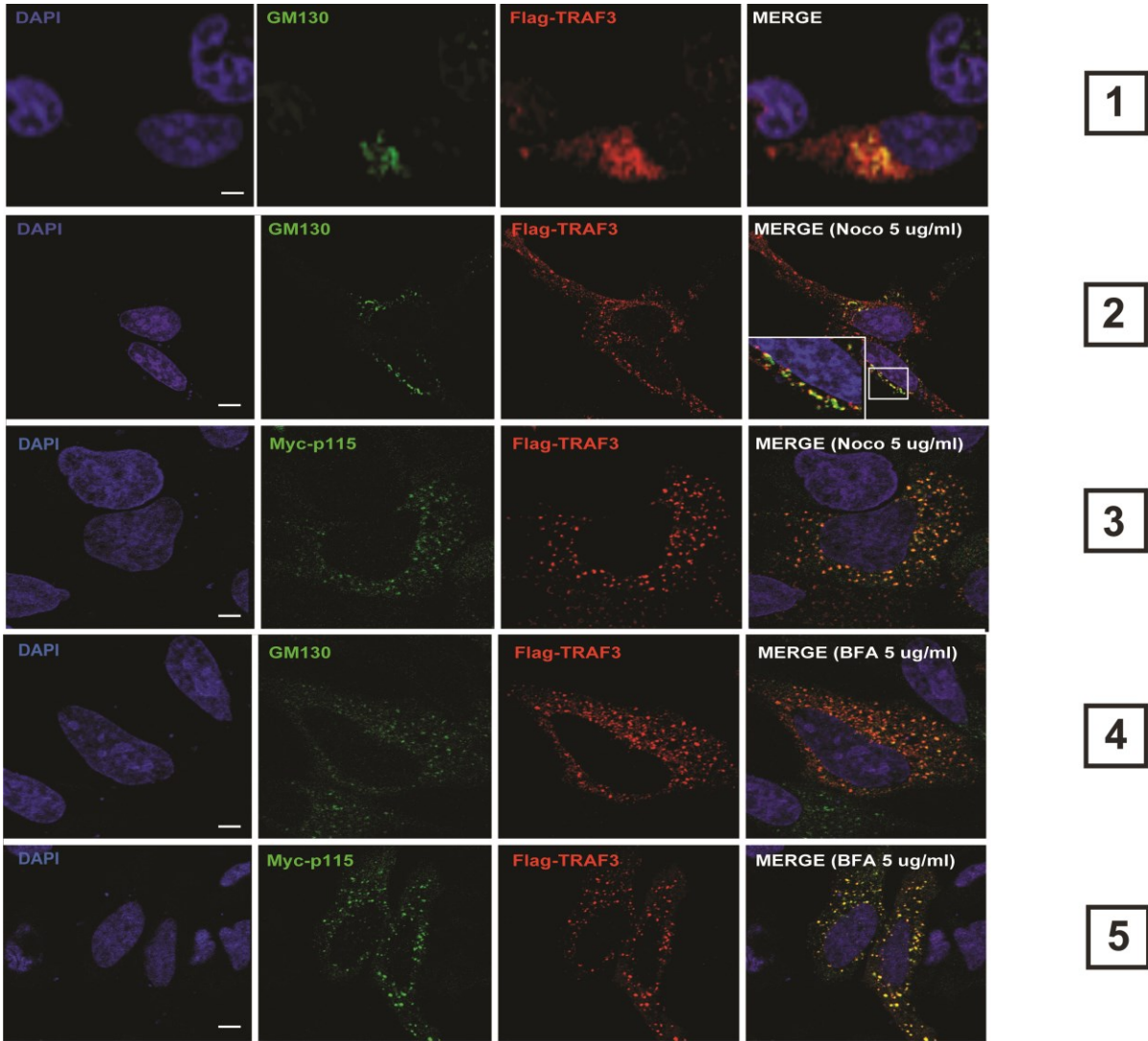
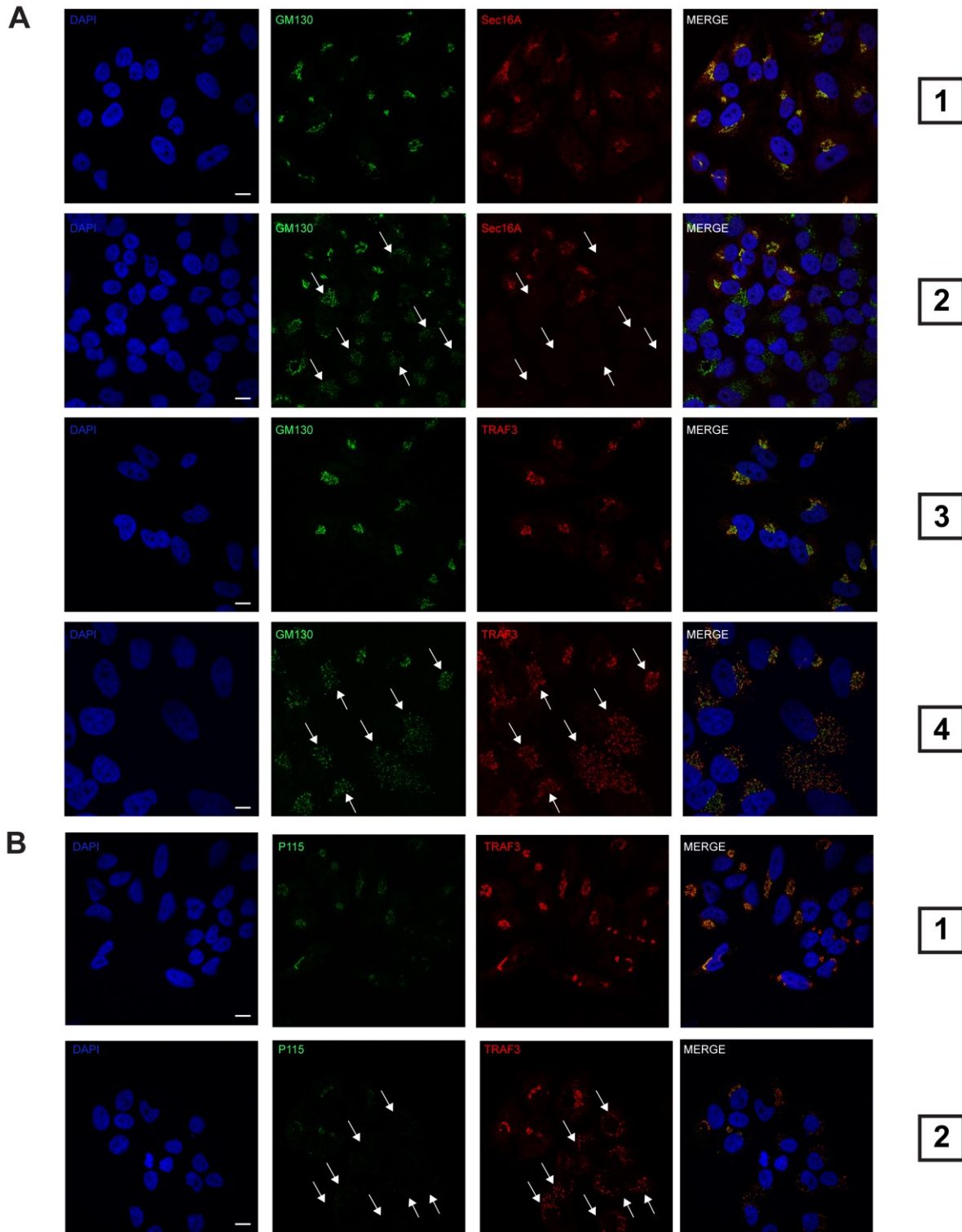


FIGURE S3



**FIGURE S4**

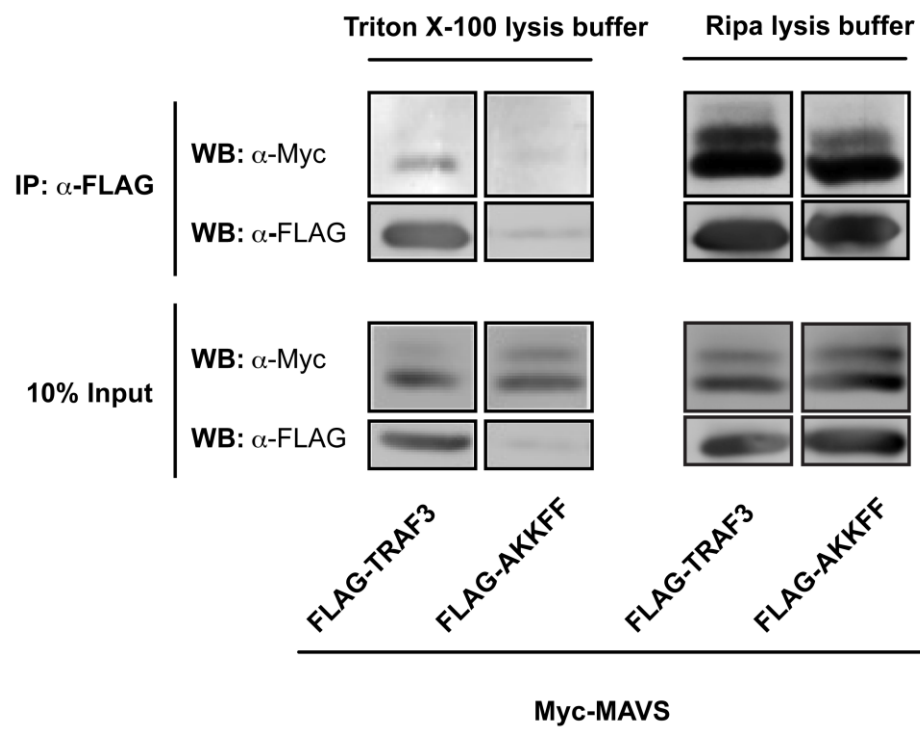
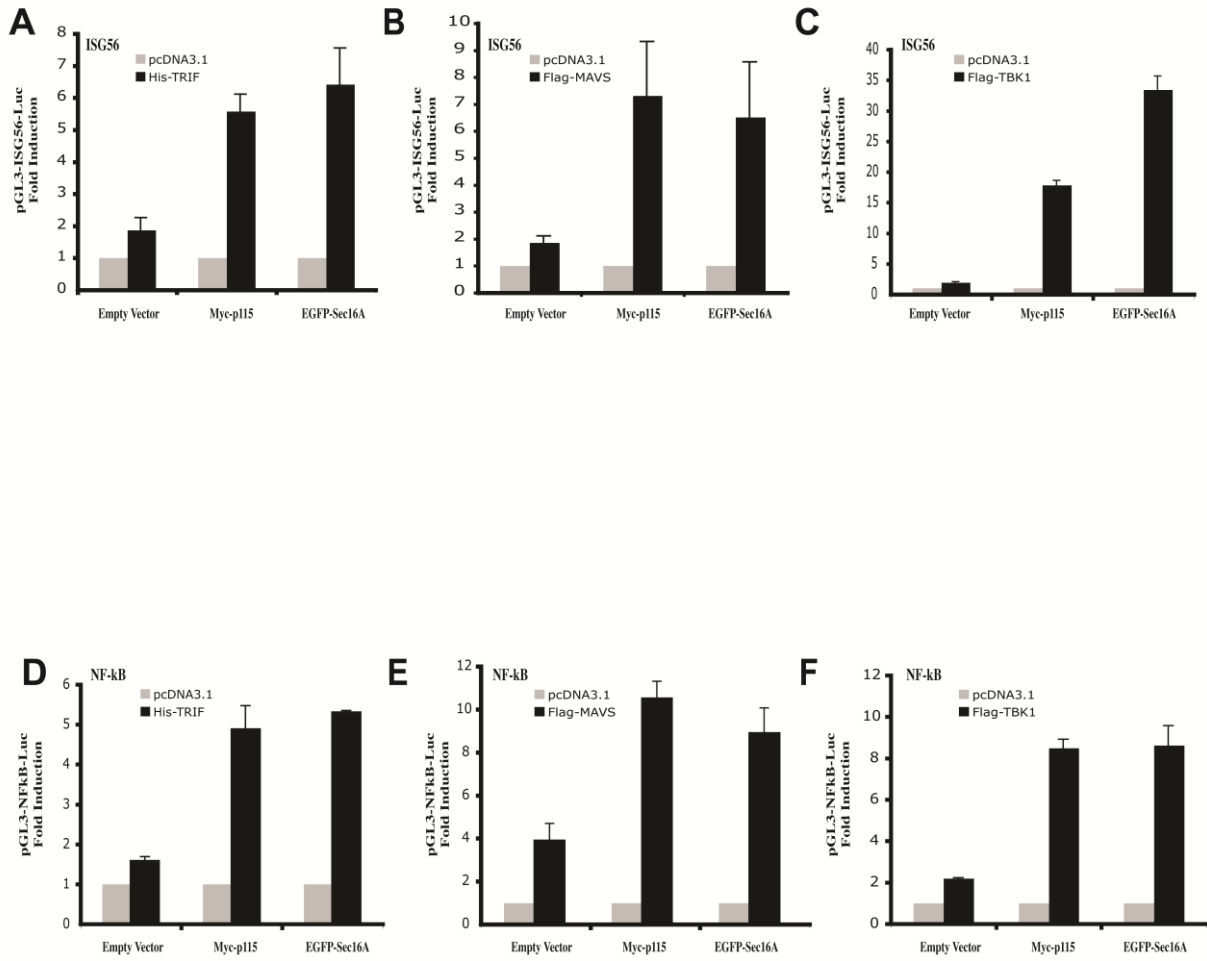
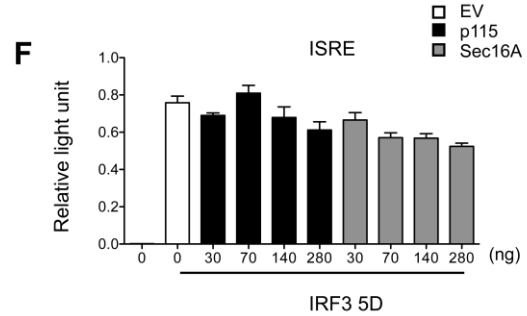
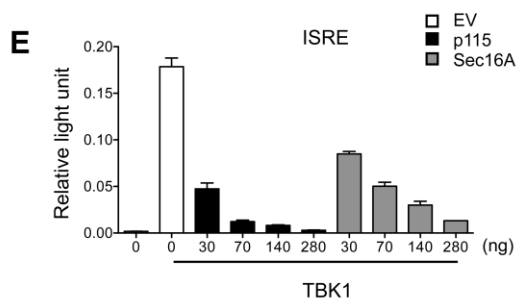
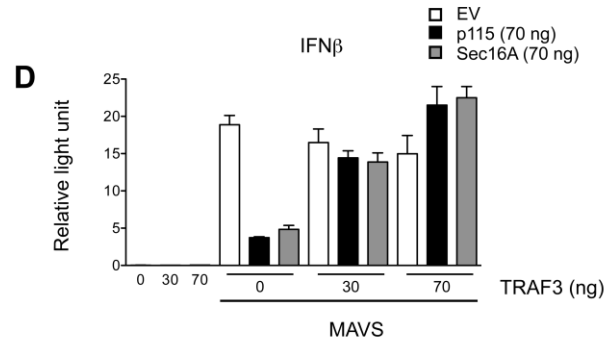
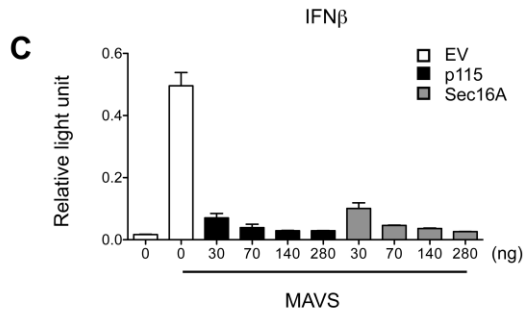
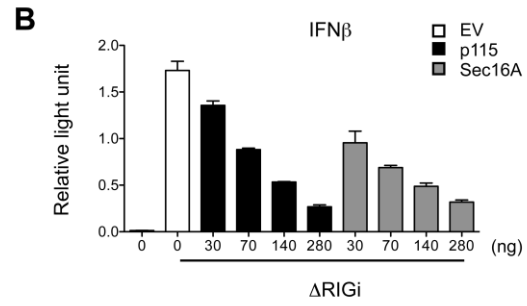
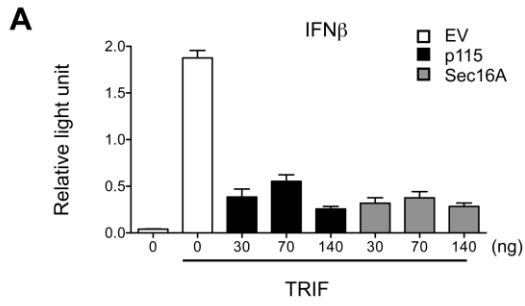


FIGURE S5



**FIGURE S6**



**FIGURE S7**

