

Université de Montréal

Identification des voies de MAPK activées par la surexpression du récepteur α_{1B} -adrénergique dans le cœur de souris

par
Marie-Josée Benoit

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

Août 2004

© Marie-Josée Benoit, 2004



w
4
U58
2005
V.060

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Identification des voies de MAPK activées par la surexpression du récepteur α_{1B} -adrénergique dans le cœur de souris

Présenté par :
Marie-Josée Benoit

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Mader (Président-rapporteur)
Hansjörg Rindt (Directeur de recherche)
Bruce G. Allen (Codirecteur de recherche)
Terry Hébert (Membre du jury)

RÉSUMÉ

La surexpression du récepteur adrénérgique α_{1B} (α_{1B} -AR) dans le coeur de souris entraîne une cardiomyopathie à progression lente associée à des signes de défaillance cardiaque et à une mort prématurée à âge moyen (Lemire *et al.*, 2001, Cardiac-directed overexpression of wild-type α_{1B} -adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy, *Am. J. Physiol.* 281: H931–H938). Dans le coeur, α_1 -AR active la cascade de ERK MAPK. Le but de ce projet était de déterminer si la surexpression cardiaque du α_{1B} -AR de type sauvage résultait en une activation soutenue de la voie de ERK. À 3 et 9 mois, l'activité de ERK était augmentée chez les souris transgéniques, comparativement aux souris non-transgéniques. De la même façon, la phosphorylation de MEK et de p90RSK étaient aussi élevées. Le niveau d'activité de p38 MAPK semblait être augmenté avec l'âge. Les phosphatases des MAPK inactivent les MAPK et leur activité est régulée au niveau de la transcription. Les niveaux d'ARNm de MKP2 étaient diminués à 3 mois chez les transgéniques. De plus, le niveau d'expression de MKP1-3 semblaient diminuer avec l'âge. L'expression de MCIP1, une protéine inhibitrice de la calcineurine, était 3 fois plus élevée chez les souris transgéniques. Ces résultats suggèrent que la surexpression du récepteur α_{1B} -AR de type sauvage mène à des changements chroniques dans l'activation des voies de signalisation associées à une réponse hypertrophique.

Mots clés : communication cellulaire, récepteur adrénérgique, signalisation, coeur, ERK, MKP, MCIP1

SUMMARY

Cardiomyocyte-specific overexpression of the wild-type α_{1B} -adrenergic receptor (α_{1B} -AR) in mice produces a slowly progressing cardiomyopathy associated with clinical signs of heart failure and premature death around middle age (Lemire *et al.*, 2001, Cardiac-directed overexpression of wild-type α_{1B} -adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy, *Am. J. Physiol.* 281: H931–H938). In the heart, α_1 -AR activate the ERK MAPK cascade. The aim of this project was to determine if cardiac-specific overexpression of the wild-type α_{1B} -AR results in sustained activation of the ERK pathway. At 3 and 9 mo ERK activity was increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts relative to non-transgenic animals. Similarly, phosphorylation of MEK and p90^{rsk} were also elevated. p38 MAPK activity seemed to be increased with age. MAP kinase phosphatases (MKPs), which inactivate MAP kinases, are transcriptionally regulated. MKP2 mRNA levels were reduced at 3 mo in α_{1B} -AR overexpressing hearts. Interestingly, there was a general trend for reduced expression of MKP-1, -2, and -3 with increased age. In addition, expression of the modulatory calcineurin-interacting protein (MCIP) 1, an indicator of calcineurin activity, was elevated 3-fold in α_{1B} -AR overexpressing hearts at both 3 and 9 mos. These results indicate that the overexpression of the wild-type α_{1B} -AR leads to chronic changes in the activation of signalling pathways previously shown to be associated with the hypertrophic response.

Keywords: cell communication, adrenergic receptor, signal transduction, heart, ERK, MKP, MCIP1.

2.3	Voie de p38 MAPK	25
2.4	Voie de JNK MAPK	26
2.5	Régulation de la phosphorylation par les phosphatases.....	26
2.5.1	Phosphatases à tyrosine	28
2.5.2	Phosphatases à sérine/thréonine.....	28
2.5.3	Phosphatases à double spécificité	32
CHAPITRE 3. Objectifs de l'étude		36
CHAPITRE 4. ARTICLE : <i>Cardiac-specific transgenic overexpression of</i> <i>α_{1B}-adrenergic receptors induces chronic activation of ERK MAPK</i> <i>signalling</i>		39
Abstract.....		40
Introduction.....		41
Materials and Methods.....		44
Results.....		48
Discussion.....		51
References.....		56
CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE		
5	Le α_{1B} -AR dans le cœur.....	74
5.1	Signalisation induite par le α_{1B} -AR dans le cœur.....	74
5.2	Surexpression du α_{1B} -AR actif, de G α q et de Ras, et l'hypertrophie cardiaque	79
5.3	Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur.....	80
5.3.1	Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et la voie de ERK.....	81
5.3.2	Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et p38 MAPK.....	83
5.3.3	Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et les phosphatase.....	87
5.3.4	Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et MCIP1	91
CHAPITRE 6. Conclusion.....		95

RÉFÉRENCES..... 98

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Structure des RCPG et variété des ligands	2
Figure 2 :	Comparaison entre un cœur transgénique surexprimant le α_{1B} -AR et un cœur non-transgénique à 9,5 mois.....	15
Figure 3:	Les 3 modules des MAPK.	20
Figure 4:	La voie de ERK et sa régulation.	22
Figure 5 :	La phosphorylation de p38 MAPK est augmentée dans les coeurs surexprimant le α_{1B} -AR de type sauvage.	86
Figure 6:	Signalisation menant à l'hypertrophie cardiaque.	92

ARTICLE: *Cardiac-specific transgenic overexpression of α_{1B} -adrenergic receptors induces chronic activation of ERK MAPK signalling.*

Figure 1:	ERK1/2 phosphorylation is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts.....	68
Figure 2:	MEK1/2 phosphorylation is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts.....	69
Figure 3:	$p90^{rsk}$ phosphorylation is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts	70
Figure 4:	Expression of MKP-1, -2 and -3 are altered with age and/or overexpression of the α_{1B} -AR.....	71
Figure 5:	Expression of MCIP is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts	72

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Résumé des changements observés lors de la surexpression du récepteur actif de façon constitutive ou du récepteur sauvage.</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 2: Changements dépendants du transgène et/ou de l'âge observés dans la présente étude.</i>	<i>77</i>

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Résultats représentatifs des immunobuvardages de type western. 85

Annexe 2: Résultats représentatifs des expériences de RT-PCR compétitive. 90

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α_{1B} -AR	Récepteur adrénérgique alpha 1B
α -MHC	Chaîne lourde de la myosine alpha
AC	Adénylate cyclase
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ANF	Atrial natriuretic factor
ARVM	Adult rat ventricular myocyte
β -MHC	Chaîne lourde de la myosine beta
CnA	Sous-unité catalytique de la calcineurine
CnB	Sous-unité régulatrice de la calcineurine
DAG	Diacylglycérol
DCM	Cardiomyopathie dilatée
DSCR1	Down's Syndrome Critical Region 1
DUSP	Dual-specificity phosphatase
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
FAK	Focal adhesion kinase
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Ksr1	Kinase suppressor of Ras
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCIP	Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1 ou modulatory calcineurin-interacting protein
MEF2	Myocyte enhancer factor-2
MK	MAPK activated-protein kinase
MKK	MAPK kinase
MKKK	MAPK kinase kinase
MKKKK	MAPK kinase kinase kinase
MKP	MAPK phosphatase

MP-1	MEK partner 1
NES	Signal d'export nucléaire
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NLS	Signal de localisation nucléaire
NTg	Non-transgénique
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PP2B	Protein phosphatase 2B
PP2C	Protéine phosphatase 2C
PTEN	Phosphatase and tensine homologue on chromosome 10
PTP-SL	Protein tyrosine phosphatase SL
PTx	Toxine pertussique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RKIP	Raf kinase inhibitor protein
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
Ser	Sérine
SERCA2	Sarco(endo)plasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase 2
STEP	Protein-tyrosine phosphatase striatum-enriched
Tg	Transgénique
Thr	Thréonine
Tyr	Tyrosine

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de maîtrise, le Dr Hansjörg Rindt. Sa patience et son enseignement durant les quelques mois où nous nous sommes côtoyés sur une base quotidienne ont fondé une bonne base qui m'a été utile lors de son départ de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Par la suite, ses connaissances et ses suggestions à distance m'ont aidée à poursuivre ce projet.

Je voudrais aussi remercier mon co-directeur, le Dr Bruce G. Allen, qui a si gentiment pris la relève lors du départ du Dr Rindt. Ses innombrables conseils et son expérience avec le 'kinome' ont fait croître mes connaissances et ma confiance dans le laboratoire. Son sarcasme quotidien et son attitude amicale ont créé une ambiance de travail vraiment agréable.

Merci également à mes collègues de travail, sans qui le laboratoire n'aurait pas la même joie de vivre. Il y a tout d'abord Aida Marie Mamarbachi, une source intarissable de renseignements sur tout ce qui a trait à la biologie moléculaire, sans qui je n'aurais pas aussi bien réussi plusieurs expériences. Marc-Antoine Gillis qui m'a beaucoup aidée à mon arrivée dans le laboratoire et qui a continué à régler tous nos petits problèmes d'ordinateurs, d'équipements défectueux, etc. Il y a aussi Karine Nadeau qui s'est occupée des souris et qui a mis un rayon de soleil dans mes journées, avec ses danses et ses chansons. Nadège Moïse, la petite nouvelle toujours prête à rendre service, et qui m'a souvent aidée quand j'en avais besoin. Merci aussi à Benoit Boivin et à Dominique Chevalier qui ont répondu à mes questions et interrogations, et qui m'ont fait une place à leurs côtés lors de mon déménagement. Un dernier merci à Julie Guimond, Nada Farah, Hala Farah, Kathy Schreiber, et aux membres des laboratoires voisins pour leurs soutiens technique et moral pendant les moments moins faciles. Sans vous tous, ces trois années ne m'auraient pas semblé si courtes.

Évidemment, je voudrais aussi remercier ma famille et mes amis. Merci de m'avoir supportée tout au long de ce merveilleux périple et ce, malgré mes sautes d'humeur. Merci à mes amis pour les discussions enrichissantes sur la science et sur moi-même, pour les divertissements et leur support moral, surtout lors de la rédaction de ce mémoire.

Finalement, merci à la FES pour les bourses d'études supérieures, et au GRSNA pour celle de voyage pour un congrès. Merci aussi au Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, autant pour le support technique que financier, et sans qui je n'aurais pas eu la chance d'assister et de présenter à plusieurs congrès scientifiques. Ces expériences furent très enrichissantes, tant au plan professionnel que personnel.

**CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET REVUE DE
LITTÉRATURE: Les récepteurs couplés aux protéines G**

1 Les récepteurs couplés aux protéines G

1.1 Importance physiologique des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transmission de signaux. Chez les mammifères, les gènes codant pour les RCPG représentent jusqu'à 1% du génome entier. De plus, entre 1% et 5% du contenu total en protéines sont des RCPG (1). Les molécules activant les RCPG sont très variées (la lumière, les molécules odorantes, les peptides, etc.) et leur nombre est considérable (Figure 1). Cette famille de récepteurs est donc impliquée dans une multitude de processus physiologiques dont le métabolisme cellulaire, la neurotransmission et le développement.

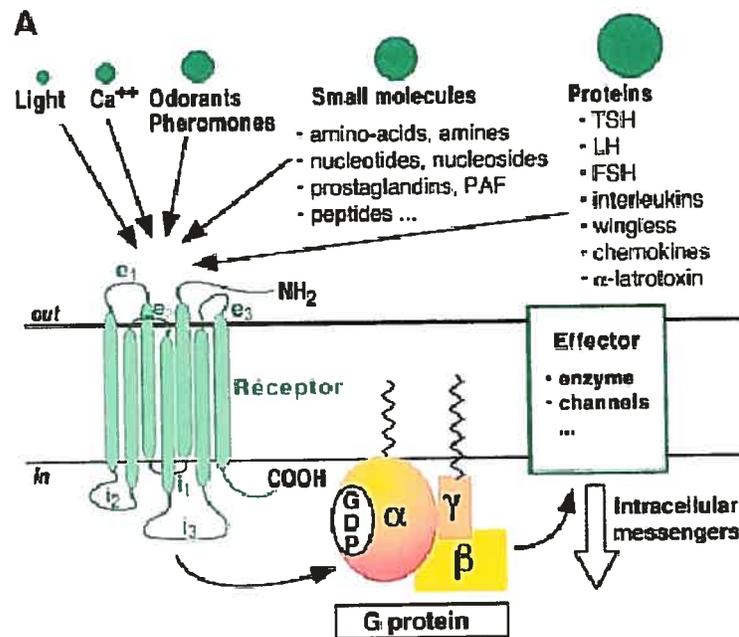


Figure 1 : Structure des RCPG et variété des ligands. (Figure tirée de Bockaert et al. (2))

1.2 Structure et classification des RCPG

Les RCPG possèdent une structure hautement conservée, composée d'un seul polypeptide contenant 7 domaines transmembranaires formant une poche hydrophobe, d'où leur nom de "récepteurs à 7 domaines transmembranaires". Ces 7 régions en hélice α sont séparées par des boucles hydrophiles intracellulaires et extracellulaires, de tailles variables. La queue COOH-terminale est intracellulaire tandis que celle NH₂-terminale est extracellulaire et elle est une cible pour la glycosylation (Figure 1). En interagissant avec les diverses protéines G, les récepteurs de cette famille activent des voies de signalisation en aval.

Les RCPG sont généralement classifiés en 3 groupes différents, selon leurs similarités de structure et de séquence (2). Le groupe 1 (récepteur de type rhodopsine) est le plus vaste et il comprend plusieurs récepteurs pour les neurotransmetteurs classiques (les amines biogéniques et les nucléotides), les prostaglandines et les peptides/neuropeptides. Il comprend aussi plusieurs récepteurs pour d'autres molécules/pigments. Le groupe 2 (récepteur à la sécrétine/glucagon) contient des récepteurs pour des hormones et des peptides distincts (glucagon, sécrétine, calcitonine, hormone diurétique, etc.). Le groupe 3, souvent appelé le groupe métabotropique du récepteur au glutamate, comprend des récepteurs pour le glutamate, le GABA et les ions Ca²⁺.

1.3 Fonctionnement des RCPG

Comme mentionné précédemment, les RCPG interagissent avec les petites protéines G afin de transmettre les signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

Ces protéines hétérotrimériques sont constituées d'une sous-unité $G\alpha$ et d'un complexe $G\beta\gamma$. Il existe au moins 23 sous-unités $G\alpha$, classifiées en 4 familles : G_i/o , G_s , $G_q/11$ et G_{12} . De plus, 6 sous-unités $G\beta$ et 12 sous-unités $G\gamma$ ont été décrites (1). Le type de la protéine G est nommé selon la nature de la sous-unité $G\alpha$.

Le processus initial de signalisation par les RCPG de la famille 1 est bien connu. Un résidu du deuxième domaine transmembranaire ainsi qu'un tripeptide à l'interface entre le troisième domaine transmembranaire et la deuxième boucle intracellulaire sont conservés dans cette sous-famille de RCPG et ils sont importants pour l'activation du récepteur (2). Lorsqu'un ligand lie le RCPG de la famille 1, il y a un changement de structure de la poche hydrophobe. La conformation des boucles intracellulaires du récepteur est altérée, ce qui permet l'association fonctionnelle du récepteur à une protéine G spécifique. Le site actif de la sous-unité $G\alpha$ relâche la molécule de guanosine diphosphate (GDP), permettant ainsi la liaison d'une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Cet échange déstabilise le complexe hétérotrimérique et cause sa dissociation en $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Il a cependant été montré que la dissociation de la protéine G en 2 sous-unités n'est pas indispensable. En effet, Bunemann *et al.* (3) ont montré que la protéine G_i subit un changement conformationnel lorsqu'elle lie le GTP, ce qui permet l'activation d'effecteurs en aval du récepteur, contrairement à la protéine G_s qui doit se dissocier afin de permettre la signalisation. La sous-unité $G\alpha$ liée au GTP et le dimère $G\beta\gamma$ peuvent interagir avec des effecteurs membranaires (e.g. canaux ioniques) ou intracellulaires (e.g. adénylate cyclase (AC), phospholipase), amenant l'amplification et la propagation de signaux à l'intérieur de la cellule. Par la suite, l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$ hydrolyse le GTP en GDP. La sous-unité $G\alpha$ retrouve

alors sa conformation inactive et son affinité pour le complexe $G\beta\gamma$. Puisque les résidus mentionnés ci-haut ne sont pas conservés chez les autres sous-familles de RCPG, le changement de conformation de la poche hydrophobe et/ou les événements moléculaires menant à l'activation de ces récepteurs ne sont peut-être pas conservés entre les membres de ces différentes familles (2).

L'interaction des RCPG à de multiples protéines G est régulée sélectivement et ce, à différents niveaux : au niveau de l'agoniste (nature, efficacité, concentration), au niveau du récepteur (variant d'épissage, palmitoylation, phosphorylation, densité de récepteur, protéines interagissant avec le récepteur, dimérisation) et au niveau de la protéine G (disponibilité, compartimentalisation, régulateurs de la signalisation des protéines G) (1). Les différentes combinaisons de sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$ agissent sur de multiples effecteurs, contribuant ainsi à la diversité et à la sélectivité de la signalisation intracellulaire activée par les RCPG. Toutefois, de plus en plus de données ne concordent pas avec le modèle de dissociation de la protéine G activée en trois sous-unités (4). Par exemple, il a été montré que la protéine G_i subit un changement conformationnel lorsqu'elle lie le GTP, ce qui permet l'activation d'effecteurs en aval du récepteur, contrairement à la protéine G_s qui doit se dissocier afin de permettre la signalisation (3).

1.4 Les récepteurs adrénergiques

1.4.1 Classification des récepteurs adrénergiques

L'adrénaline et la noradrénaline sont deux catécholamines libérées par les terminaisons du système nerveux central, en tant que neurotransmetteurs, mais aussi par

les glandes médullosurrénales, en tant qu'hormones. Des études pharmacologiques ont permis de montrer que les récepteurs adrénergiques (AR) possédaient des affinités spécifiques pour ces deux molécules, et que la signalisation induite était diversifiée: la neurotransmission sympathique, la modulation du métabolisme hépatique, le contrôle du tonus vasculaire, la contraction cardiaque et la régulation de l'activité des muscles lisses dans le système génito-urinaire ((5)). Ces RCPG ont alors été divisés en 2 sous-groupes : les α et les β . Il existe 9 sous-types de AR, dont 3 α_1 (α_{1A} , α_{1B} et α_{1D}), 3 α_2 (α_{2A} , α_{2B} et α_{2C}) et 3 β (β_1 , β_2 et β_3). Dans les prochaines sections, une attention particulière sera portée au α_{1B} -AR puisqu'il constitue le point central de la présente étude.

1.4.2 Les récepteurs adrénergiques dans le cœur

Le système nerveux sympathique et le système cardiovasculaire sont interconnectés par les AR, ce qui permet une régulation rapide des fonctions cardiaques et vasculaires (6). Une courte stimulation des α -AR affecte le métabolisme du glucose du cœur, la consommation d'oxygène par les mitochondries, la contraction des muscles lisses des vaisseaux sanguins, les propriétés électrophysiologiques, etc. (7). Toutefois, si la stimulation de ces récepteurs est soutenue, l'expression de gènes peut être altérée et mener à l'hypertrophie cardiaque. De plus, il a été suggéré que les α_1 -AR auraient des rôles à jouer dans plusieurs pathologies humaines telles l'athérosclérose, l'hypertension et les arythmies cardiaques (8). La distribution et le niveau d'expression diffèrent pour chacun des sous-types de α_1 -AR et entre les espèces. De plus, ces patrons d'expression peuvent être altérés dans diverses conditions et/ou pathologies (9).

Dans le cœur de souris, le sous-type α_{1B} est le plus abondant de la famille des α_1 -AR et il lie principalement la protéine Gq (10,11). La signalisation via cette voie mène à l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ peut ensuite lier un récepteur à la surface du réticulum sarcoplasmique et entraîner une libération de Ca²⁺. Ce calcium permet l'activation de protéines dépendantes du calcium, comme certains isoformes de la PKC. Quant au DAG, il peut recruter la protéine kinase C (PKC) à la membrane et l'activer. PKC peut ensuite phosphoryler différents substrats cellulaires comme des canaux calciques et des tyrosines kinases de type récepteur ou non (12). À leur tour, ces tyrosines kinases peuvent phosphoryler des protéines adaptatrices comme Shc, permettant le recrutement de Grb2-Sos à la membrane. Sos est un facteur d'échange de GTP qui facilite l'échange de la molécule de GDP liée à la petite protéine G (e.g. Ras) pour une molécule de GTP. Comme décrit plus en détails dans la section 2.2.1, il y a alors recrutement de Raf à la membrane et propagation du signal jusqu'au noyau.

1.5 Hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque est un facteur de risque majeur pour le développement d'arythmies, de prolongation du potentiel d'action des myocytes, de défaillance cardiaque suivie de la mort (13-15). Dans les stades initiaux, l'hypertrophie est une réponse compensatoire à une augmentation du stress sur les parois. De cette façon, elle permet au myocarde d'adapter sa performance contractile aux changements de charges via une augmentation de la taille du cœur et/ou du volume des myofibres, sans changement du

nombre de myocytes. De plus, il y a une induction de gènes embryonnaires dont l'ANF (atrial natriuretic factor) et la β -MHC (β -myosin heavy chain) (14,15). Toutefois, si le stimulus hypertrophique est intense et maintenu, l'hypertrophie devient décompensée, i.e. l'hypertrophie ne suffit plus à fournir la force nécessaire au cœur afin de compenser pour le stress sur les parois, ce qui mènera, de façon ultime, à la défaillance cardiaque (13). La norépinéphrine, l'endothéline et l'angiotensine sont des inducteurs hypertrophiques directs sur les cardiomyocytes. La signalisation intracellulaire pouvant mener à l'hypertrophie comprend les mitogen-activated protein kinase (MAPK), la protéine kinase C (PKC), la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), le nuclear factor of activated T cells (NFAT), Ras, Gq, la calcineurine, etc. (11,15-17,18,19). De plus, le calcium possède plusieurs fonctions dans le cœur dont le contrôle de la contraction des myocytes et la croissance du cœur, lors du développement embryonnaire et dans les pathologies (20,21).

1.6 Surexpression du α_{1B} -AR

La progression de l'intégration de la régulation des activités des α_1 -AR a été ralentie par la faible disponibilité d'agonistes et d'antagonistes spécifiques pour les sous-types de récepteur. De plus, l'administration systémique d'agonistes des α_1 -AR affecte la pression périphérique, ce qui peut affecter le cœur. La surexpression spécifique des sous-types de α_1 -AR élimine ces problèmes. Cependant, le type de promoteur utilisé dans la construction du transgène affecte le niveau d'expression ainsi que sa spécificité cellulaire. Par exemple, si le promoteur du α_{1B} -AR lui-même est utilisé, le récepteur muté sera exprimé dans les tissus où le α_{1B} -AR est normalement présent. À l'opposé,

une expression limitée au cœur est possible grâce au promoteur de la chaîne lourde de la myosine alpha (α -MHC), l'isoforme prédominant de la MHC chez la souris adulte (22). Ce promoteur a l'avantage de limiter les effets périphériques de la surexpression du récepteur sur le phénotype observé. De plus, l'activation du promoteur de la α -MHC commence seulement après la naissance, empêchant ainsi les effets lors du développement embryonnaire de l'animal.

1.6.1 Surexpression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive

L'expression d'un récepteur actif de façon constitutive permet d'étudier la signalisation de ce récepteur, même en absence d'agoniste. La mutation de résidus spécifiques sur le récepteur augmente son affinité pour les agonistes et permet sa liaison aux protéines G, même en absence d'agoniste, ce qui permet l'activation constitutive du récepteur. Comme mentionné dans la section 1.4.2, le récepteur de type sauvage est couplé à l'activation de la PLC, menant donc à une augmentation de la quantité de DAG intracellulaire. De la même façon, dans un premier modèle de souris transgénique (Tg) étudié (23), l'expression du récepteur muté cause une augmentation de la quantité totale de DAG, i.e. environ 75% plus que chez les souris non-transgéniques (nTg). De plus, deux signes d'hypertrophie cardiaque sont observés chez les Tg (à 10 semaines) : le ratio poids du cœur/poids du corps augmente de 20% et l'aire transversale des myocytes augmente de 62%. Finalement, il y a 4 fois plus d'ANF dans le cœur des souris Tg.

Dans un autre modèle d'expression du récepteur actif (24), chez les transgéniques de 4 à 6 mois, le ratio poids du cœur/poids du corps et l'épaisseur de la paroi postérieure et celle du septum interventriculaire sont augmentés. Chez les Tg, le diamètre des

ventricules durant la diastole et la systole augmentent, mais la pression sanguine artérielle diminue, peut-être à cause de la diminution d'environ 50% de la quantité totale sanguine d'adrénaline et de noradrénaline (à 6 mois).

Dans un troisième modèle d'étude d'expression du récepteur actif (25), des niveaux élevés d'activation de la extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) (26) et la c-jun N-terminal kinase (JNK) sont observés chez les transgéniques. Le diamètre du ventricule gauche durant la systole et la diastole augmentent chez ces souris. De plus, il y a une diminution du pourcentage de raccourcissement des myocytes chez les Tg, ce qui indique une performance cardiaque réduite.

En conclusion, l'expression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive mène à une hypertrophie cardiaque modérée, caractérisée par une augmentation du poids du cœur, de l'épaisseur des parois, et du niveau d'activation de ERK et JNK MAPK. De plus, il a été montré qu'une expression de la forme activée de MKK1, une kinase activatrice de ERK, entraîne une hypertrophie cardiaque concentrique compensée ((27)). Les modèles étudiés diffèrent au niveau du promoteur et des résidus mutés, ce qui peut faire varier les voies activées et les niveaux d'expression du récepteur, affectant le phénotype observé ainsi que sa profondeur. De plus, la surexpression de protéines mutées pourrait entraîner des interactions et une signalisation peu ou pas physiologique.

1.6.2 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage

1.6.2.1 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage sous le contrôle du promoteur du α_{1B} -AR

La surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage permet d'étudier la signalisation en aval du récepteur. En effet, puisqu'un faible pourcentage de récepteurs s'activent spontanément, une forte densité de récepteurs résulte en une signalisation significative en aval de ce même récepteur. Dans un premier modèle de souris étudié (24), le transgène était sous le contrôle du promoteur du α_{1B} -AR et l'expression du récepteur dans le cœur était environ 2 fois supérieure à celle observée chez les souris normales. Chez les transgéniques de 4 à 6 mois, la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage cause une faible augmentation de la production d'IP₃, montrant ainsi l'augmentation de la signalisation via Gq. Le ratio poids du cœur/poids du corps et l'épaisseur de la paroi postérieure et du septum interventriculaire sont aussi augmentés et les performances cardiaques sont diminuées. Chez les Tg, aucune hypotension n'est observée et il n'y a pas de diminution d'adrénaline ni de noradrénaline, contrairement au modèle de la surexpression du récepteur actif de façon constitutive dans cette même étude.

1.6.2.2 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage sous le contrôle du promoteur de la α -MHC

Dans un autre modèle de souris étudié, le promoteur utilisé est le α -MHC et l'expression cardiaque du récepteur est environ 43 fois supérieure à celle observée chez les souris normales. La quantité totale de DAG est augmentée, démontrant une plus grande signalisation via Gq (de 2 à 5 mois) (11). À 5 mois, les marqueurs moléculaires

de l'hypertrophie cardiaque ne sont pas induits, excepté l'ANF (11), et la structure des myofibrilles et des sarcomères est intacte (11,28). Le ratio poids du ventricule gauche/poids du corps, l'aire transversale du ventricule gauche et la pression systolique du ventricule gauche ne sont pas changés. Chez les Tg, le rythme cardiaque et l'activité de l'AC de base et suite à une stimulation à l'isoprotérénol sont diminués (11). La toxine pertussique (PTx) permet le retour de l'activité de l'AC à un niveau normal, ce qui suggère que la forte expression du α_{1B} -AR favorise la liaison du récepteur aux protéines sensibles à la PTx (11). Une diminution de la performance du ventricule gauche est observée, i.e. il y a une diminution du niveau basal de contraction, mais le rythme cardiaque reste le même (28). De plus, la pression ventriculaire gauche est diminuée, mais la pression à la fin de la systole et de la diastole ainsi que la pression auriculaire gauche sont augmentées (28). Suite à la stimulation des β -AR, la fonction du ventricule gauche est diminuée. Une augmentation de l'activité de la β -ARK1 est observée dans les cœurs Tg. Les cœurs transgéniques sont limités dans leur capacité à performer contre de fortes charges. Ainsi, dans ce modèle de surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage, aucune hypertrophie cardiaque n'est observée aux âges étudiés mais la performance contractile est diminuée.

Dans deux études de Lemire et al. (29,30), le même modèle de souris a été utilisé, mais des croisements ont permis d'obtenir une expression du α_{1B} -AR de type sauvage environ 150 fois supérieure à celle normale. Les souris surexprimant le α_{1B} -AR de type sauvage sous le contrôle de la α -MHC développent des signes de défaillance cardiaque, suivis d'œdème et de la mort. La progression du phénotype a été suivie à intervalles réguliers, soit à 3 mois, à 6 mois, à 9 mois et suite à la défaillance cardiaque. Les 4

chambres des cœurs défaillants sont dilatées (Figure 2). Le poids des cœurs défaillants augmentent de 2,5 fois tandis qu'il est inchangé chez les souris Tg sans défaillance. Ceci suggère une hypertrophie cardiaque excentrique dans les stades finaux de la cardiomyopathie. En effet, dans les cœurs de souris Tg de 9 mois sans défaillance, les 4 chambres sont dilatées et déformées, mais l'épaisseur des parois et du septum ne sont pas altérées. Les myofibres sont désalignées mais aucune fibrose n'est observée. La α -MHC est augmentée chez les nTg de 9 mois mais diminuée chez les Tg de 9 mois, comparativement aux nTg de 3 mois. Le niveau d'ANF est augmenté chez les nTg de 6 et 9 mois, et à tous les âges chez les Tg, incluant chez les souris avec la défaillance cardiaque, comparativement à celui des souris nTg de 3 mois. La sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) est diminuée chez les Tg de 9 mois et dans le groupe défaillant, comparativement aux nTg de 3 mois. La SERCA2 est moins exprimée chez les Tg de 3 et 9 mois, comparativement aux nTg de même âge. La titine est augmentée chez les Tg de 3 mois mais diminuée chez les Tg de 9 mois, le groupe défaillant, les nTg de 6 et 9 mois, comparativement aux nTg de 3 mois. Il a été montré que l'expression de la titine est diminuée dans les cardiomyopathies dilatées, qu'elle sert d'amorce pour l'organisation de nouveaux filaments sarcomériques et qu'elle influence les propriétés élastiques des sarcomères. Le phospholamban (PLB) est augmenté chez les Tg de 3 mois comparativement aux nTg de 3 mois. L'expression de la calséquestrine est habituellement inchangée dans l'hypertrophie et dans les cardiomyopathies dilatées (DCM). Cependant, elle est diminuée chez les Tg de 3 mois comparativement aux nTg de 3 mois. À 3 mois, l'activité basale de l'AC est augmentée mais la quantité d'AMPc est inchangée. Toutefois, l'augmentation de l'activité de l'AC suite à la stimulation par

l'isoprotérénol est diminuée chez les Tg, comparativement aux nTg. Une désensibilisation des β -AR est aussi notée via, entre autres, une perte du site de liaison de haute affinité pour l'isoprotérénol. Chez les Tg, une augmentation de l'activité de trois isoformes de la PKC (δ , ϵ et β II) pourrait être associée dans la désensibilisation hétérologue des β -AR par les α_{1B} -AR. Finalement, l'expression de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est diminuée chez les Tg de 9 mois comparativement aux nTg de 9 mois. Tous ces changements prédisposent les souris au développement de cardiomyopathie dilatée. De plus, l'âge et les changements sarcomériques (MHC et titine) jouent peut-être un rôle important dans le développement final de la myopathie. De plus, ces changements lents et progressifs sont observés chez l'humain souffrant de DCM.

En résumé, l'augmentation de l'expression de gènes fœtaux ((17), (23), (28)), la diminution de l'expression de la α -MHC ((30)), l'augmentation du ratio poids du cœur : poids du corps ((30), (23), (28)) et l'augmentation de l'activité de certains isoformes de la PKC ((14)) sont des changements typiques observés dans le cœur hypertrophié. De plus, la diminution de l'abondance et de l'activité de la SERCA2 sont deux changements observés lors d'une diminution de la fonction diastolique ((30)). Finalement, la titine est habituellement diminuée dans les DCM et dans l'hypertrophie décompensée ((30), (31)).

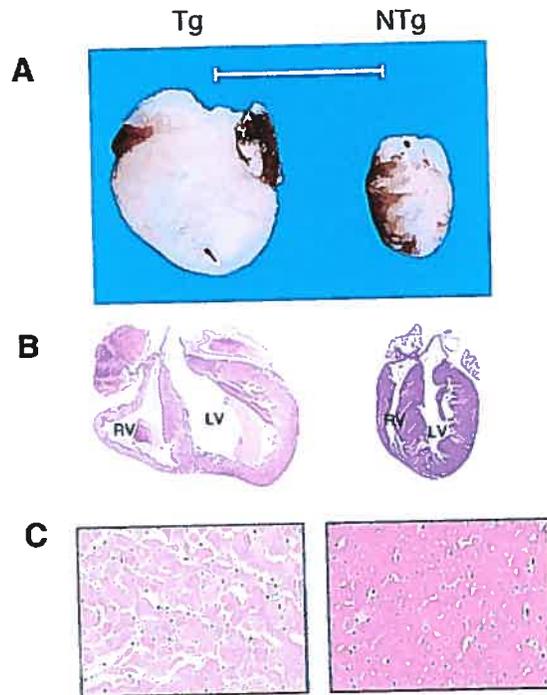


Figure 2 : Comparaison entre un cœur transgénique surexprimant le α_{1B} -AR et un cœur non-transgénique à 9,5 mois. (Figure tirée de Lemire et al. (30))

En conclusion, une forte expression du α_{1B} -AR de type sauvage mène à une diminution de la performance cardiaque, à une faible augmentation ou non du poids du cœur et de l'épaisseur des parois et à des changements dans l'expression de certains gènes (e.g. ANF). Aucune hypertrophie n'est observée dans les cœurs transgéniques où le transgène est sous le contrôle du promoteur de la α -MHC, sauf dans les stades tardifs de la cardiomyopathie, contrairement à celui sous le contrôle du α_{1B} -AR. Des effets secondaires entraînés par une expression non-limitée au cœur causent peut-être cette hypertrophie. Les données obtenues suggèrent que la phase finale du développement du phénotype soit une hypertrophie cardiaque excentrique décompensée résultant en une

mort prématurée des souris. Certaines des différences observées entre les études peuvent être causées par le niveau d'expression du α_{1B} -AR ainsi que sa localisation déterminée par le promoteur utilisé, les réponses différentes pour chacune des souches de souris, l'âge et le sexe des souris, etc. De plus, comme mentionné précédemment, une forte expression de protéines peut favoriser des interactions moins physiologiques : par exemple, la surexpression du α_{1B} -AR favorise sa liaison aux protéines sensibles à la PTx plutôt qu'à Gq. Ces différences peuvent affecter la signalisation ainsi que le phénotype observés.

De nombreuses différences phénotypiques sont observées entre les modèles de surexpression du récepteur actif de façon constitutive comparativement à ceux de surexpression du récepteur de type sauvage (voir le Tableau 1), et plusieurs facteurs pourraient les expliquer. Il y a tout d'abord la diminution de la quantité totale sanguine d'adrénaline et de noradrénaline chez le modèle de surexpression du récepteur actif, pouvant ainsi résulter en une augmentation ou une diminution de la signalisation via certaines voies. Ensuite, les mutations activatrices pourraient entraîner des interactions moins physiologiques avec des effecteurs, via une altération de leur structure. De plus, il a été montré que la surexpression du récepteur de type sauvage augmentait son interaction avec les protéines G_i , ce qui change l'activité des voies en aval du récepteur. Dans le même ordre d'idées, la signalisation induite par le récepteur actif entraîne peut-être l'inhibition d'autres voies de signalisation, lesquelles ne seraient pas affectées par le récepteur de type sauvage. Finalement, la signalisation induite par le récepteur actif est peut-être plus forte, plus soutenue que celle obtenue par une forte expression.

Récepteur actif	Récepteur type sauvage
↑ DAG	↑ ANF
↑ ratio poids du cœur/poids du corps	↑ IP ₃ et DAG
↑ aire transversale des myocytes	↑ ratio poids du cœur/poids du corps (certaines études)
↑ épaisseur des parois	↑ épaisseur des parois (certaines études)
↑ diamètre des ventricules	↓ performance contractile
↑ activité de ERK et JNK	Dilatation des 4 chambres cardiaques
↓ [adrénaline et noradrénaline] sanguine	↓ α-MHC
↓ pourcentage de raccourcissement des myocytes	↓ SERCA2
	↑ titine

Tableau 1 : Résumé des changements observés lors de la surexpression du récepteur actif de façon constitutive ou du récepteur de type sauvage.

**CHAPITRE 2. ORGANISATION ET RÉGULATION DE LA
SIGNALISATION INTRACELLULAIRE**

2 Organisation et régulation de la signalisation intracellulaire

2.1 Voies des mitogen-activated protein kinase

La phosphorylation des protéines sur les résidus sérine (Ser), thréonine (Thr) et tyrosine (Tyr) est une modification post-traductionnelle critique qui est au cœur des mécanismes de régulation des activités cellulaires (32). Les niveaux de phosphorylation des protéines sont dictés par les activités opposées des protéines kinases et des protéines phosphatases. Le nombre élevé de gènes codant pour ces enzymes démontre leur importance fondamentale dans la physiologie cellulaire.

Les MAPK possèdent un rôle crucial dans la propagation du signal intracellulaire vers le noyau. Elles sont d'importants médiateurs de la régulation des facteurs de transcription contrôlant la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation (12,33,34). Dans les cardiomyocytes, la cascade de signalisation des MAPK est initiée par les RCPG, les récepteurs Tyr kinase, le stress cellulaire et la cardiotrophine-1 (35). Trois groupes principaux de MAPK ont été caractérisés dans les cellules mammifères : ERK, JNK et p38 MAPK.

De manière simpliste, les voies des MAPK sont composées par l'assemblage de 3 protéines kinases (Figure 3). Ce modèle est conservé de la levure jusqu'à l'homme (35,36). La première kinase de ce modèle est la MAPK kinase kinase (MKKK) et elle peut être activée par une MAPK kinase kinase kinase (MKKKK) ou par une interaction avec les protéines de la famille de Ras ou Rho. Les MKKK sont des kinases à Ser/Thr qui, lorsque activées, phosphorylent et activent la kinase en aval dans le module, soit la MAPK kinase (MKK). Les MKK sont des kinases à double-spécificité qui reconnaissent et phosphorylent la Thr et la Tyr dans un motif Thr-X-Tyr (TEY pour ERK, TPY pour

JNK et TGY pour p38 MAPK) dans la boucle d'activation des MAPK, les kinases à Ser/Thr finales dans les modules à 3 kinases (37) (Figure 3).

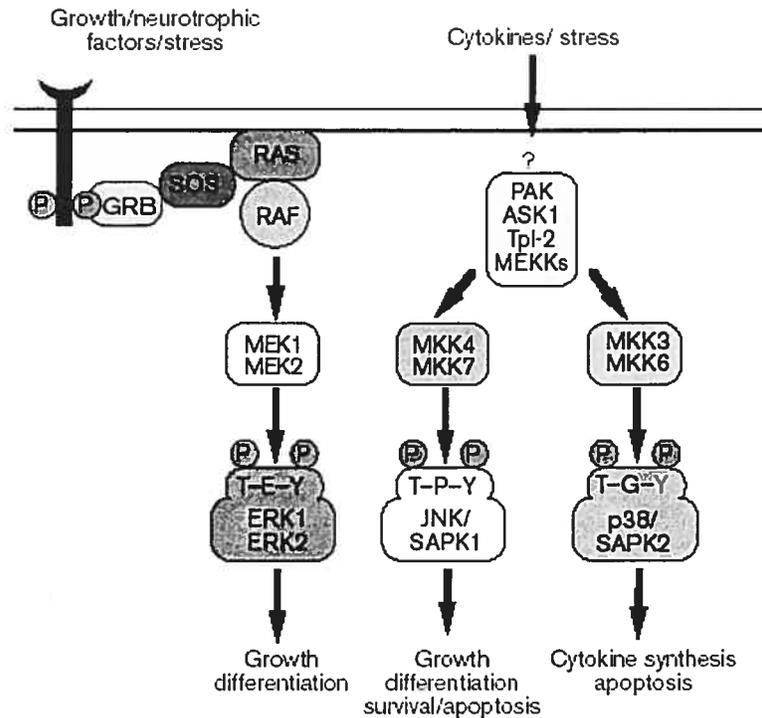


Figure 3: Les 3 modules des MAPK. (Figure modifiée, tirée de Keyse (38))

Chez les mammifères, il existe un haut degré d'homologie entre les 3 modules de MAPK et ce, autant dans l'organisation générale qu'au niveau protéique. La séquence primaire en acides aminés est fortement similaire entre les différentes MAPK, i.e. 60% entre ERK, JNK et p38 MAPK (39). De plus, les substrats pour ces 3 MAPK principales montrent des motifs consensus de phosphorylation semblables. Alors, comment la spécificité est-elle possible? Comment la régulation croisée inappropriée entre les voies parallèles est-elle limitée? Deux mécanismes sont utilisés: les protéines d'échafaudage et les sites d'ancrage. Pour la voie de ERK, ces 2 mécanismes seront décrits plus en détails

dans la section 2.2.2. Dans les prochaines sections, une attention plus particulière sera portée à la voie de ERK puisqu'elle constitue un des points centraux de la présente étude.

2.2 Voie de ERK MAPK

2.2.1 Protéines de la cascade de signalisation

La voie MAPK la mieux connue est celle de Ras/ERK (Figure 4). L'amplification du signal via cette cascade est efficace à un point tel qu'une activation de seulement 5% des protéines Ras totales est suffisante pour induire l'activation totale de ERK (39). Cette voie débute par Ras, une petite protéine G monomérique. À l'aide de protéines accessoires (e.g. Grb2 et Sos), la protéine Ras est activée par l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP. Par la suite, elle recrute la kinase Raf à la membrane cellulaire où elle est activée à son tour. Raf est une kinase à Ser/Thr essentielle pour la prolifération cellulaire et pour déterminer le destin des cellules au cours du développement. Afin de propager le signal en aval, Raf active la kinase MEK en la phosphorylant sur 2 résidus Ser situés dans sa boucle d'activation. MEK est une kinase à double-spécificité qui peut phosphoryler ERK sur 2 résidus Thr et Tyr dans le motif TEY (Figure 3). ERK fait partie de la famille des kinases à Ser/Thr et elle possède au moins 50 substrats dont des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des phosphatases et d'autres kinases. Ceci montre le rôle important de cette kinase dans l'expression génique, la synthèse protéique et la progression du cycle cellulaire (12,40). Le type cellulaire et l'expression spécifique à une situation déterminent les substrats potentiels disponibles. De plus, la localisation sous-cellulaire des protéines régule leur accessibilité.

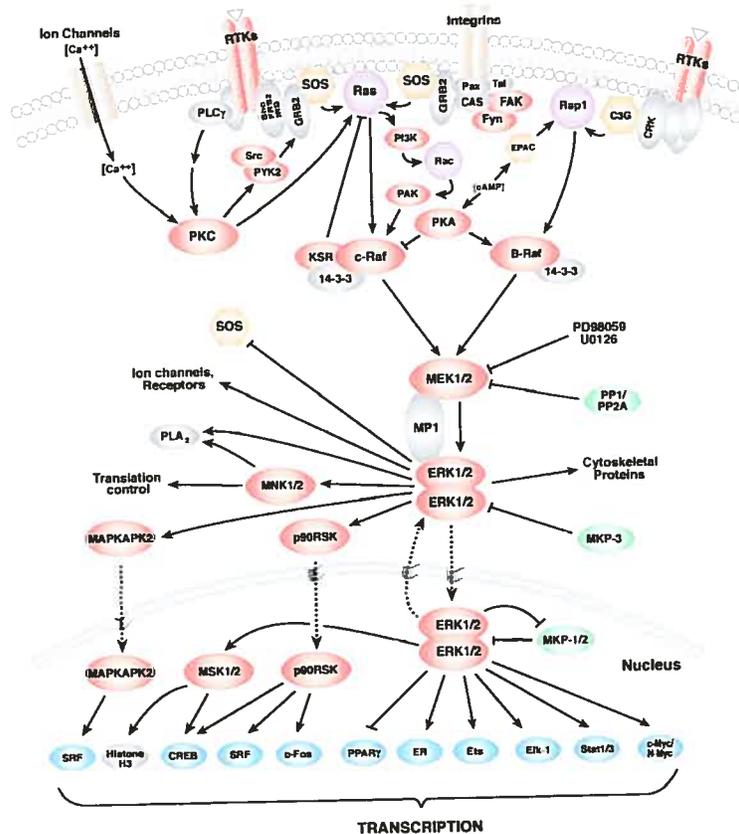


Figure 4: La voie de ERK et sa régulation. (Figure tirée du site web de Cell Signalling)

Lorsqu'elle est activée de façon soutenue, la kinase ERK dimérise, transloque au noyau et y phosphoryle divers substrats. La signalisation est ensuite arrêtée via la déphosphorylation de ERK par des phosphatases nucléaires (39,41). Toutefois, les mécanismes d'import/export nucléaire de ERK sont encore mal compris. En effet, ERK ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (NLS). La dimérisation de ERK dépendante de la phosphorylation est peut-être impliquée dans son import nucléaire. De plus, il a été montré que ERK interagit directement avec les complexes de pores nucléaires: la diffusion passive pourrait expliquer le transport de ERK au noyau. De la même façon, ERK ne possède pas de signal d'export nucléaire (NES) mais MEK en a un

puissant, ce qui lui permettrait d'attirer et de retenir ERK nucléaire inactif hors du noyau. Par exemple, dans les cellules non-stimulées, MEK1 lie ERK et, grâce à son NES, le complexe MEK1-ERK reste dans le cytoplasme. Cette interaction prévient, entre autres, l'accumulation de ERK au noyau donc la phosphorylation de substrats nucléaires (42).

ERK pourrait aussi réguler l'import nucléaire de ses substrats, comme ceux de la famille des RSK. Dans les cellules non-stimulées, ERK et RSK peuvent former un complexe dans le cytoplasme (43). Suite à la stimulation, ERK peut phosphoryler RSK et ces 2 kinases sont transportées dans le noyau où elles phosphorylent des substrats distincts. La famille des RSK contient 3 isoformes, RSK1 ou p90-RSK, RSK2 et RSK3, encodés par 3 gènes différents, avec 75-80% d'homologie de séquence en acides aminés. Les 3 isoformes sont exprimés dans plusieurs tissus, mais leurs patrons d'expression sont différents. Dans les cellules au repos, les RSK sont cytoplasmiques et nucléaires, mais suite à une stimulation, une partie des RSK cytoplasmiques activés transloquent au noyau. Les substrats des RSK sont variés, ce qui suggère que ces kinases soient impliquées dans la régulation d'une multitude de fonctions cellulaires (44). Les RSK peuvent aussi être activés par des voies indépendantes de ERK (45).

2.2.2 Échafaudage et ancrage de la voie de ERK

Comme mentionné dans la section 2.1, deux mécanismes permettent une signalisation spécifique et rapide. Les protéines d'échafaudage sont le premier mécanisme de contrôle. Elles créent des complexes multi-enzymatiques spécifiques qui rassemblent les composantes d'une cascade de kinases, permettant ainsi la propagation rapide et spécifique du signal dans la voie (39,40,46). Dans la voie de ERK, au moins 3

protéines d'échafaudage ont été identifiées : RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein), MP-1 (MEK Partner 1) et Ksr1 (Kinase Suppressor of Ras) (Figure 4).

La protéine RKIP (Raf kinase inhibitor protein) peut lier Raf-1, MEK et ERK mais pas simultanément. Elle bloque l'interface Raf-1/MEK, c'est-à-dire qu'elle empêche la phosphorylation de MEK par Raf, sans affecter la phosphorylation de ERK par MEK, ni la phosphorylation de Elk-1 par ERK, ni l'autophosphorylation de Raf-1. La stimulation de la voie de ERK induit la dissociation de RKIP et Raf-1, permettant ainsi l'activation de MEK et de ERK. À l'inverse, quand l'activité de ERK diminue, RKIP se ré-associe à Raf-1 (40,46).

Chez les mammifères, MP1 (MEK partner 1) lie MEK1 et ERK1, mais pas MEK2 ni ERK2, ce qui permet une plus forte activation de ERK1. Un partenaire de MP1, p14, a été découvert récemment. Le complexe MP1-p14 retient MEK1 et ERK1 à la surface cytoplasmique des endosomes tardifs où p14 est localisé. Il a été montré que, avec une réduction du niveau de MP1 et p14, la propagation du signal est déficiente (39,47).

Ksr1 (kinase suppressor of Ras) est une autre protéine d'échafaudage de cette voie et elle lie Raf-1, MEK et ERK. Ksr1 interagit directement avec MEK et ERK, via des domaines distincts tandis que l'interaction avec Raf semble être indirecte. En réponse à des facteurs de croissance, Ksr1 transloque du cytoplasme vers la membrane cellulaire où il lie MEK et ERK, les rapprochant du complexe de signalisation actif de Raf (47).

Les sites d'ancrage spécifiques sont le deuxième mécanisme de régulation de la spécificité et de la rapidité de la signalisation. Ils permettent la liaison appropriée de substrats activateurs et régulateurs, augmentant ainsi la fidélité et l'efficacité des réactions enzymatiques. En effet, des sites d'ancrage ont été identifiés sur des protéines

interagissant avec ERK : substrats (TFII-I (48)), activateurs (MEK1 (49)), protéines d'échafaudage (vinexine (50)) et phosphatases (MKP2 (51), MKP3 (52)). De plus, il a été montré que ces interactions sont mutuellement exclusives, permettant ainsi un mécanisme moléculaire pour l'activation et l'inactivation de ERK. De plus, l'état de phosphorylation de ces protéines peut moduler l'affinité d'interaction (39).

2.3 Voie de p38 MAPK

La voie de p38 MAPK médie la réponse cellulaire aux stress environnementaux (Figure 3). En effet, chez les mammifères, elle est activée par plusieurs stimuli dont les rayons UV, les chocs thermique et osmotique, l'arsenite de sodium, les lipopolysaccharides bactériens et les cytokines proinflammatoires. Les processus physiologiques affectés via la signalisation de la voie de p38 MAPK incluent la progression du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la réponse inflammatoire. Chez les mammifères, il y a 4 isoformes de p38 MAPK: α , β , δ et γ . Ces 4 kinases sont phosphorylées et activées par MKK3 et MKK6 (sauf l'isoforme β), des MKK situées en amont dans la cascade de protéines kinases. Mik et PAK sont des exemples de MKKK dans cette voie. Les cibles de p38 MAPK sont variées et comprennent des facteurs de transcription et certaines Ser/Thr kinases (MK2, MK3, MK5, MNK1, MNK2, MSK1 et MSK2) (12,53). Chez les mammifères, la localisation sous-cellulaire de p38 MAPK n'est pas bien définie mais une étude a montré que p38 MAPK serait nucléaire dans les cellules au repos. Puisque p38 MAPK ne possède pas de NLS, il a été proposé que les MK auraient peut-être un rôle d'ancre nucléaire pour p38 MAPK (53). Tout comme pour

la voie de ERK, des protéines d'échafaudage ainsi que des sites d'ancrages facilitent la propagation du signal via la voie de p38 MAPK.

2.4 Voie de JNK MAPK

Une autre voie de MAPK est celle de JNK (Figure 4). Les protéines JNK ont été identifiées initialement comme 2 protéines kinases ($p46^{JNK1}$ et $p54^{JNK2}$) pouvant phosphoryler le facteur de transcription c-Jun (54). Tout comme la voie de p38 MAPK, celle de JNK est activée par le stress cellulaire, les rayons UV, les chocs thermiques et osmotiques et les cytokines. Elle est aussi impliquée dans diverses fonctions biologiques incluant le développement, la migration cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire, d'où son rôle dans les pathologies telles le cancer, l'Alzheimer, le Parkinson, l'hypertrophie et l'ischémie cardiaques (12,54). À ce jour, la famille JNK contient 3 membres principaux (JNK1-3) et plusieurs variants d'épissage (54). JNK phosphoryle des facteurs de transcription comme ATF2, Elk-1 et c-Myc, ainsi que d'autres protéines comme celles de la famille Bcl-2 (12,54). JNKK1/MKK4/SEK1 et JNKK2/MKK7 sont des MKK qui activent les kinases JNK en les phosphorylant sur des résidus Thr et Tyr dans le motif TPY (54) (Figure 3). Il existe plusieurs MKKK dans cette voie dont MEKK, ASK1 et MLK. Tout comme pour les voies de ERK et p38 MAPK, des protéines d'échafaudage ainsi que des sites d'ancrages facilitent la propagation du signal via la voie de JNK.

2.5 Régulation de la phosphorylation par les phosphatases

La régulation de la signalisation intracellulaire est essentielle et la déphosphorylation des MAPK par les phosphatases est un mécanisme très important. Le

type cellulaire ainsi que les stimuli affectent les phosphatases impliquées dans la régulation des MAPK (53). Trois types de phosphatases peuvent inactiver les MAPK : les phosphatases à tyrosine, les phosphatases à sérine/thréonine et les phosphatases à double spécificité thréonine/tyrosine « dual-specificity phosphatase, DUSP ».

Comme mentionné précédemment, l'activation enzymatique des MAPK requiert une double-phosphorylation par des activateurs spécifiques en amont. Par conséquent, chaque MAPK est une candidate pour la double déphosphorylation par les phosphatases des MAPK (MKP). Cependant, comment la spécificité des partenaires kinase/phosphatase est-elle régulée? Il a été suggéré que les phosphatases agiraient de manière séquentielle, sous l'influence de différents stimuli extracellulaires. Dans les cellules au repos, une activité basale des cascades de kinases mène à la phosphorylation des MAPK et il est important pour les cellules de contrôler cette activité via une déphosphorylation constante. Ce rôle serait peut-être attribué aux phosphatases à Ser/Thr, comme la protéine phosphatase 2A (PP2A), et aux MKP exprimées sans stimulation (39). Suite à une stimulation de courte durée, ces phosphatases continuent de déphosphoryler les MAPK. Toutefois, suite à une stimulation de longue durée, les MAPK phosphorylées peuvent transloquer au noyau, phosphoryler des cibles nucléaires jusqu'à ce que les phosphatases nucléaires soient induites, synthétisées et terminent le signal. Ainsi, selon la durée du signal et la distribution des phosphatases dans les différents compartiments de la cellule, les phosphatases forment une machinerie de régulation précise qui contrôle l'étendue, la localisation et la durée du signal des MAPK.

2.5.1 Phosphatases à tyrosine

Les phosphatases à tyrosine sont des régulateurs critiques de la transmission des signaux. Avec les tyrosines kinases, elles régulent la phosphorylation de résidus tyrosine, contrôlant ainsi des processus physiologiques fondamentaux comme la croissance cellulaire, la différenciation, le cycle cellulaire, le métabolisme, etc. De plus, il a été montré qu'une perturbation de cet équilibre pouvait mener au développement de maladies comme le diabète et le cancer (55). Chez *C. elegans*, 2,2% de tous les gènes codent pour des protéines kinases tandis qu'environ 0,5% semblent être des phosphatases à Tyr (32). Plus de 50 phosphatases à Tyr ont été identifiées et caractérisées, et STEP (protein-tyrosine phosphatase striatum-enriched) et PTP-SL (protein tyrosine phosphatase SL) sont 2 exemples de phosphatases à Tyr qui interagissent physiquement avec ERK (38). PTEN (phosphatase and tensine homologue on chromosome 10) est une phosphatase à Tyr associée au cytosquelette d'actine et elle est impliquée dans plusieurs processus dont la migration cellulaire, la croissance cellulaire et les interactions avec la matrice extracellulaire. La surexpression d'une forme dont l'activité catalytique a été abolie entraîne une hypertrophie cardiaque. De plus, il a été montré que PTEN diminue l'hypertrophie cardiaque en inhibant FAK (focal adhesion kinase) ((56)).

2.5.2 Phosphatases à sérine/thréonine

Comme leur nom le mentionne, les phosphatases à sérine/thréonine déphosphorylent les résidus sérine et thréonine. Cette famille comprend de nombreux membres dont la PP2A et la protéine phosphatase 2C (PP2C) (Figure 4). Ces 2 phosphatases sont exprimées de façon constitutive et elles sont localisées principalement

dans le cytosol. PP2A est hautement conservée dans l'évolution des eucaryotes. Plusieurs études ont démontré son implication dans la régulation du métabolisme cellulaire, la réplication de l'ADN, l'épissage de l'ARN, la traduction, la progression du cycle cellulaire, la morphogenèse, le développement et la transformation, ainsi que de la régulation de plus de 30 protéines kinases dont la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase B (PKB), la protéine kinase C (PKC), p70 S6 kinase et ERK (41,57).

PP1 est une phosphatase à Ser/Thr impliquée dans la régulation de la réponse cellulaire aux agonistes β . Elle est située dans la membrane du réticulum sarcoplasmique et est régulée par 2 protéines inhibitrices, I1 et I2. Il a été montré qu'une diminution de la quantité d'AMPC, via la désensibilisation des β -AR, mène à l'inactivation de PKA et à une augmentation de l'activité de PP1. Cette augmentation peut mener à un découplage de la contractilité cardiaque, à une DCM, à une mort prématurée et à une hypertrophie cardiaque (augmentation de l'ANF, de la β -MHC et de l'actine squelettique) ((58)).

La calcineurine, ou la protéine phosphatase 2B (PP2B), est une phosphatase à Ser/Thr unique puisqu'elle répond aux signaux calciques soutenus, de faible fréquence. Elle est composée de 2 sous-unités, i.e. une sous-unité catalytique (CnA) et une sous-unité régulatrice B (CnB). Son activation se fait via la liaison du complexe Ca^{2+} /calmoduline (CaM), ce qui déplace le domaine d'auto-inhibition de la sous-unité CnA (20,59). Ainsi, la calcineurine couple des signaux calciques à des réponses cellulaires spécifiques via la déphosphorylation de protéines. De plus, la calcineurine est exprimée dans plusieurs types cellulaires et ses actions dépendent d'une variété de protéines effectrices qui influencent son activité enzymatique, sa distribution sous-cellulaire et sa stabilité. La calcineurine est un inducteur efficace de la croissance

cardiaque (20). Par exemple, un transgène actif de la calcineurine dans le cœur cause une croissance hypertrophique qui mène à une cardiomyopathie dilatée suivie d'une défaillance cardiaque (60). De plus, puisque le promoteur de MKP1 est sensible à la calcineurine, le niveau d'expression de MKP1 est augmenté tandis que celui de MKP2 reste le même. L'expression d'une forme activée de la calcineurine entraîne une augmentation de l'activité de MKP1 ((61), (62)). La calcineurine peut agir directement sur d'autres effecteurs dont NFAT (nuclear factor of activated T cells). Lorsqu'il est déphosphorylé, NFAT peut transloquer au noyau, s'y accumuler et activer des gènes cibles, avec la coopération de plusieurs partenaires dont MEF2 (myocyte enhancer factor-2) (14,63). Finalement, d'autres protéines transmettent des signaux vers le noyau, de façon dépendante de la calcineurine, affectant ainsi la transcription de gènes (20,60). Certains RCPG peuvent aussi activer la calcineurine tout comme Ras, les 3 voies de MAPK et PKC. Ces voies de signalisation ont souvent été liées à l'induction de réponses hypertrophiques (62). De plus, l'activation de la calcineurine est associée à celle de ERK, PKC α , PKC θ et JNK ((61)) mais avec l'inactivation de p38 MAPK ((62)). Ainsi, la calcineurine est impliquée dans une multitude de voies de signalisation et ce, à divers niveaux.

MCIP (myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1 ou modulatory calcineurin-interacting protein ou DSCR1, Down's Syndrome Critical Region 1) est une protéine inhibitrice de la calcineurine qui est hautement conservée de la levure jusqu'à l'homme (14). Il existe 3 types de MCIP chez les mammifères, soit MCIP1, MCIP2 et MCIP3, et ils ont des patrons d'expression différents (63,64). Chez l'humain, MCIP1 et MCIP2 possèdent des variants d'épissage, 4 et 2 respectivement (65), et ils sont exprimés

à de forts niveaux dans les muscles striés et le cerveau. Chez l'humain, MCIP3 ne possède pas de variants d'épissage et est exprimé à de faibles niveaux dans plusieurs tissus.

Les rôles de l'interaction entre MCIP1 et la calcineurine sont variés, selon la nature et l'intensité du stimulus, du type cellulaire, du modèle d'étude, du niveau d'expression des 2 protéines, etc. (66). Cependant, la stœchiométrie entre les 2 protéines est critique pour maintenir le niveau voulu d'activité de la calcineurine. En effet, le niveau d'expression de MCIP1 donne une indication de l'état d'activation de la calcineurine (64). Par exemple, une forte concentration de MCIP1 inhibe l'activité phosphatase de la calcineurine en liant directement la sous-unité CnA, atténuant ainsi l'hypertrophie (60,66). Cette liaison ne requiert ni ne prévient la liaison de CnB ni de CaM. Il a été suggéré que la protéine MCIP1 soit en compétition avec le domaine d'auto-inhibition de CnA et qu'elle lie préférentiellement la forme activée de la calcineurine (65). Cependant, en plus faible quantité, MCIP1 semble nécessaire pour une réponse hypertrophique complète. De plus, la calcineurine et NFAT peuvent induire l'expression de MCIP1, et MCIP1 est stabilisé par la calcineurine activée, créant ainsi une boucle de rétro-inhibition (14,60,64-66). Il a été suggéré que des mécanismes autres que ceux dépendants du calcium réguleraient l'expression de MCIP1 (67), et que MCIP1 soit la cible d'une régulation via la phosphorylation/déphosphorylation, permettant ainsi l'intégration d'autres signaux dans la voie de la calcineurine (68). Finalement, MCIP1 pourrait diriger la calcineurine vers des domaines sous-cellulaires ou des substrats spécifiques.

2.5.3 Phosphatases à double spécificité

Neuf membres de la famille des DUSP ont été isolés et caractérisés dans les cellules mammifères. Ils possèdent une structure commune comprenant un domaine catalytique homologue à la phosphatase à double spécificité (VH-1) de vaccinia virus, et une queue NH₂-terminale non-catalytique, contenant 2 courtes régions d'homologie de séquence avec les domaines catalytiques de la phosphatase cdc25 (38).

Les MKP font partie de cette famille (Figure 4). L'expression tissulaire, la régulation en réponse à divers stimuli, la localisation sous-cellulaire et la spécificité de substrat sont différentes pour chacune des MKP. Les MKP peuvent être classées grossièrement en 2 groupes selon ces propriétés. Les phosphatases du premier groupe sont nucléaires, encodées par des 'immediate-early genes' donc induites rapidement par des facteurs de croissance ou un stress cellulaire. MKP1 et MKP2 font partie de ce groupe. À l'inverse, les phosphatases du deuxième groupe, comme MKP3 (57,69), sont cytosoliques et leur transcription est induite par des stimuli spécifiques prolongés et non par des stress environnants. Les MKP purifiées sont actives de façon constitutive, ce qui suggère que le point principal de régulation de l'activité des MKP soit au niveau de la transcription (70). Toutefois, ceci n'élimine pas la possibilité que des modifications post-traductionnelles affectent l'activité des MKP.

MKP1 et MKP2 sont exprimées dans la plupart des tissus étudiés (cœur, cerveau, rate, poumon, muscle squelettique, etc.), mais leurs patrons d'expression sont différents, suggérant des rôles physiologiques variés pour les membres de la famille des MKP. Pour de multiples raisons, MKP1 et MKP2 sont les meilleurs candidats de l'inactivation de ERK dans le noyau. Tout d'abord, l'expression de ces 2 phosphatases est induite par une

variété de signaux dont le stress cellulaire, les lipopolysaccharides, les facteurs de croissance de l'épiderme et les cytokines (39). La voie de signalisation de ERK induit l'expression de MKP1 et MKP2, formant ainsi une boucle de rétro-inhibition (70,71). Ces 2 phosphatases sont nucléaires et possèdent un site d'ancrage pour ERK, participant ainsi à la localisation nucléaire de ERK. Finalement, MKP1 et MKP2 sont des substrats directs de ERK puisque, lorsqu'elles sont phosphorylées, elles sont moins sensibles à la dégradation et ERK active MKP1 en liant son extrémité NH₂-terminale (39).

Les études portant sur la spécificité de substrat pour les MKP sont nombreuses mais les résultats sont parfois contradictoires, peut-être à cause des types cellulaires, des niveaux d'expression des MKP et des MAPK, des stimuli, etc. De plus, l'activité des phosphatases *in vivo* et *in vitro* peuvent varier. Dans la plupart des cellules étudiées et à des niveaux d'expression physiologiques, MKP1 déphosphoryle plus efficacement p38 MAPK (37,46,62,69,71-73). Toutefois, à des niveaux d'expression élevés, JNK et, moins fortement, ERK peuvent être déphosphorylés par MKP1. Il a été montré que la surexpression de MKP1 bloque l'activation de ERK((74)), la ré-entrée dans le cycle cellulaire (70,71), diminue l'expression de gènes fœtaux suite à l'ajout d'agonistes hypertrophiques ((75)) ainsi que l'hypertrophie ((76), (77)). Pour ce qui est de MKP2, ERK et JNK en sont de bons substrats. Au contraire, p38 MAPK est faiblement déphosphorylé par MKP2 (32). Finalement, dans les cœurs humains avec une DCM, les niveau d'expression de MKP-1 et MKP-2 sont augmentés.

Pour ce qui est de la phosphatase MKP3, elle est exprimée dans plusieurs tissus incluant le cœur, le pancréas et le cerveau. De plus, la liaison du domaine NH₂-terminal de MKP3 à ERK, et non à JNK ni à p38 MAPK, augmente jusqu'à 30 fois son activité

phosphatase (38,39,57,69,78-80). De plus, la voie de ERK induit la synthèse de MKP3 (69), créant ainsi une boucle de rétro-inhibition. Finalement, l'activité phosphatase de MKP3 est très forte envers ERK mais très faible ou nulle pour JNK et p38 MAPK.

CHAPITRE 3. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

3 Objectifs de l'étude

Le modèle utilisé pour la présente étude est la souris surexprimant, sous le contrôle du promoteur de la α -MHC, le α_{1B} -AR de type sauvage. L'expression est environ 150 fois plus élevée que celle observée de façon physiologique. Une très forte expression entraîne une activation spontanée d'un nombre de récepteurs et ce, même en absence de ligand, résultant, entre autres, en une augmentation de la quantité de DAG dans le cœur ((11)). Le but du projet était de vérifier le degré d'activation de la voie de ERK, au niveau des kinases et des phosphatases, et celui de la kinase p38 MAPK dans les cœurs de souris transgéniques. Plusieurs études ont utilisé ce modèle et les résultats obtenus sont décrits dans la section 1.6.2.2.

- a) Comme mentionné précédemment, le α_{1B} -AR active ERK et il a été montré que cette MAPK est impliquée dans le développement de l'hypertrophie. Puisque la surexpression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive mène à une hypertrophie cardiaque tardive et modérée, et que l'activité de ERK est augmentée, nous avons voulu vérifier l'activité des différentes composantes de la voie de ERK et p38 MAPK en réponse à la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage. Des immunobuvardages de type western nous ont permis de voir le niveau de phosphorylation donc d'activation des kinases, relativement à leur quantité totale.
- b) Les MKP ont un rôle important dans la signalisation et leur niveau d'activité est principalement régulé au niveau de l'expression. Nous avons utilisé la méthode de reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) compétitive afin de vérifier la quantité d'ARNm de MKP1-3.

c) La calcineurine est impliquée dans l'hypertrophie et puisque les modèles murins surexprimant une forme active du α_{1B} -AR montrent des signes d'hypertrophie, nous avons voulu vérifier si la surexpression du récepteur de type sauvage affectait le niveau d'activité de la calcineurine. Nous avons utilisé la méthode d'immunobuvardage de type western afin de quantifier MCIP1, donnant ainsi un reflet direct de l'activité de la phosphatase.

CHAPITRE 4. ARTICLE : *Cardiac-specific transgenic overexpression of α_{1B} -adrenergic receptors induces chronic activation of ERK MAPK signalling*

**Cardiac-specific transgenic overexpression of α_{1B} -adrenergic receptors induces
chronic activation of ERK MAPK signalling**

Marie-Josée Benoit†, Hansjörg Rindt†, and Bruce G. Allen†§

‡ Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, PQ, Canada, H3C 3J7
and Institut de Cardiologie de Montréal, Centre de Recherche, 5000 rue Bélanger,
Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

§ Department of Medicine and the Groupe de Recherche sur le Système Nerveux
Autonome, Université de Montréal, Montréal, PQ, Canada, H3C 3J7

† Myogen Inc., Westminster, Colorado 80021

Address for Correspondence: Bruce G. Allen, Centre de Recherche, Institut de
cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger, Montréal, PQ, Canada, H1T 1C8. Tel:
(514) 376-3330 (3591). Fax: (514) 376-1355. XXXXXXXXXX

Abstract

Cardiomyocyte-specific overexpression of the wild-type α_{1B} -adrenergic receptor (α_{1B} -AR) produces a slowly progressing cardiomyopathy associated with clinical signs of heart failure and premature death around middle age (Lemire *et al.*, 2001, Cardiac-directed overexpression of wild-type α_{1B} -adrenergic receptor induces dilated cardiomyopathy, *Am. J. Physiol.* 281: H931–H938). In the heart, α_1 -AR activate the ERK MAPK cascade. The aim of this project was to determine if cardiac-specific overexpression of the wild-type α_{1B} -AR results in sustained activation of the ERK pathway. At 3 and 9 mo ERK activity was increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts relative to non-transgenic animals. Similarly, phosphorylation of MEK and p90^{sk} were also elevated. MAP kinase phosphatases (MKPs), which inactivate MAP kinases, are transcriptionally regulated. MKP2 mRNA levels were reduced at 3 mo in α_{1B} -AR overexpressing hearts. Interestingly, there was a general trend for reduced expression of MKP-1, -2, and -3 with increased age. In addition, expression of the modulatory calcineurin-interacting protein (MCIP) 1, an indicator of calcineurin activity, was elevated 3-fold in α_{1B} -AR overexpressing hearts at both 3 and 9 mos. These results indicate that the overexpression of the wild-type α_{1B} -AR leads to chronic changes in the activation of signalling pathways previously shown to be associated with the hypertrophic response.

Keywords: cell communication, adrenergic receptor, signal transduction, heart, ERK, MKP, MCIP1.

Introduction

α_1 -adrenergic receptors (α_1 -AR) belong to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs). Based upon pharmacological and molecular analyses, the α_1 -ARs have been classified into three subtypes: α_{1A} -AR, α_{1B} -AR and α_{1D} -AR (Minneman and Esbenshade 1994; Minneman et al. 1994). In addition, splice variants of α_{1A} -AR have been identified. All 3 subtypes are present on adult and neonatal cardiac myocytes, differing with respect to transcriptional regulation of their expression (Rokosh et al. 1996; Wenham et al. 1997), but absent from neonatal cardiac fibroblasts (Stewart et al. 1994). In rat heart α_{1A} -AR and α_{1B} -AR are present in a ratio of ca 20 : 80 (Michel et al. 1994). Similarly, in the mouse heart, α_{1B} -AR is the major subtype. Each α_1 -AR couples predominantly to G_q, resulting in activation of phospholipase C β (PLC) which, in turn, hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) to produce the second messengers 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) (see (Fedida et al. 1993; Zhong and Minneman 1999)). These messengers modulate protein kinase C (PKC) activity and cytosolic calcium concentration, respectively. In cultured neonatal rat cardiac myocytes, α_1 -AR agonists induce a hypertrophic response (Meidell et al. 1986; Simpson 1983; Simpson 1985).

Hypertrophic stimuli including cardiotrophin-1 (CT-1), endothelin-1 (ET-1), phenylephrine (PE), isoproterenol (ISO), angiotensin II (AngII), phorbol ester, and mechanical stretch have been shown to activate the ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Depletion of ERK using antisense oligonucleotides reduce PE-induced hypertrophic response in myocytes (Glennon et al. 1996) whereas pharmacological inhibition of MEK activation, or expression of an inactive mutant of ERK1 fail to block all of the phenotypic changes associated with CT-1-, ET-1-, or PE-induced hypertrophy (Aoki et al. 2000; Nemoto et al. 1998; Post et al. 1996; Sheng et al. 1997; Thorburn et al. 1994). In contrast, transfection with a constitutively active mutant of MEK1, resulting in ERK activation, increased ANP expression, increased cell size and

sarcomeric reorganization while a dominant negative MEK1 mutant inhibits ET-1, PE, ISO, AngII, and stretch-induced increase in ERK activity, ANP expression cell size and sarcomeric reorganization (Gillespie-Brown et al. 1995; Ueyama et al. 2000). Similarly, expression of a dominant negative form of Raf-1 prevented the development of hypertrophy in response to pressure overload resulting from transverse aortic constriction (Harris et al. 2004). However, ERK is also activated by non- or anti-hypertrophic agents, suggesting that activation of the ERK cascade alone may be insufficient to produce a hypertrophic response (Adams et al. 1998; Clerk et al. 1996; Post et al. 1996; Silberbach et al. 1999). In adult ventricular myocytes, inhibition of cPKC isoforms during prolonged exposure to PE converted ERK activation from a transient into a sustained response and evoked a hypertrophic response that was blocked by a MEK inhibitor, PD98059 (Schreckenbergh et al. 2004). PE-induced activation of the ERK cascade appears to be mediated primarily by the α_{1B} -AR subtype (Wenham et al. 1997); however, the role of the ERK cascade in cardiac myocyte hypertrophy remains controversial.

There is a lack of adequately subtype-selective α_1 -AR ligands and, hence, transgenic mice play an important role in determining the specific function of the α_1 -AR subtypes in regulating cardiac growth and function. Although it was previously shown in cultured neonatal rat ventricular myocytes that the hypertrophic effects of PE are mediated by α_{1A} -AR (Knowlton et al. 1993), an activated mutant of the α_{1B} -AR induces hypertrophy within 10 weeks when expressed in myocytes under control of the α -myosin heavy chain (α MyHC) promoter (Milano et al. 1994) whereas hypertrophic effects of chronic noradrenalin or sub-pressor PE infusion are absent in α_{1B} -AR-deficient mice (Vecchione et al. 2002). Tissue-specific overexpression of the wild type hamster α_{1B} -AR, under control of an isogenic promoter, also increases heart size (Zuscik et al. 2001). In male mice, an α_{1A} -AR and α_{1B} -AR double knock-out (α_{1AB} -ARKO) results in load-independent reduction in both heart and myocyte size, suggesting both α_{1A} -AR and α_{1B} -AR are required for normal cardiac growth (O'Connell et al. 2003). In α_{1AB} -ARKO

myocytes, PE, a non-subtype-selective α_1 -agonist, no longer activates ERK whereas this pathway is still responsive to phorbol ester and ET-1. Furthermore, basal ERK activity in α_{1B} -ARKO hearts is reduced to 29% of that in wild type hearts (O'Connell et al. 2003). α MyHC-directed overexpression of the wild-type α_{1B} -AR produces a late-onset hypertrophy similar to humans (Lemire et al. 2001). The purpose of the present work was to examine the ERK pathway at 3 and 9 mos to determine if chronic changes in the activation of this pathway are associated with overexpression of wild type α_{1B} -AR and the cardiomyopathy caused by wild type α_{1B} -AR overexpression. The activity of MEK, ERK and p90^{rsk}, components within the ERK MAPK pathway, was elevated at 9 months. MAP kinase phosphatase (MKP) 1, 2, and 3 mRNA levels were changed in a transgene- and/or age-dependant manner. Furthermore, expression of the modulatory calcineurin-interacting protein (MCIP) 1, an indicator of calcineurin activity, was increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts at both 3 and 9 months. Hence, cardiac-specific overexpression of the wild type α_{1B} -AR resulted in chronic, sustained changes in signalling within the ventricular myocardium

Materials and Methods

Materials. Membrane-grade (reduced) Triton X-100, leupeptin, and PMSF were from Roche Molecular Biochemicals. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis reagents (SDS-PAGE), nitrocellulose, and Bradford protein assay reagents were from Bio-Rad Laboratories. Microcystin LR was from Calbiochem. cAMP-dependant protein kinase inhibitor peptide (PKI, amino acid sequence TTYADFIASGRTGRRNAIHD) was from the University of Calgary Peptide Synthesis Core Facility. Antisera for ERK1 (sc-93), ERK2 (sc-154), p90^{RSK} (sc-231) and p38 MAP kinase (sc-535) were from Santa Cruz Biotechnology Inc. Antisera for phospho-ERK1/2 (9101), phospho-p90^{RSK} (9344), MEK (9122), phospho-MEK (9121) and phospho-p38 (9211) were from Cell Signalling Technology. Antisera to MCIP1 was prepared as described previously (Bush et al. 2004). HRP-conjugated secondary antibodies were from Jackson Laboratories. All other reagents were of analytical grade or best grade available. NanoPure-grade water was used throughout these studies.

Transgenic mice. These studies employed a line of transgenic mice engineered to express the wild-type α_{1B} -adrenergic receptor under the control of the α -myosin heavy chain promoter. The production and initial characterization of the transgenic mouse line have been described previously (Chalothorn et al. 2002; Lemire et al. 1998; Lemire et al. 2001). Transgenic animals were genotyped by performing PCR on ear-punch biopsies using specific primers, as described previously (Lemire et al. 1998).

Preparation of total heart lysate. 10-14 and 34-40 week-old transgenic mice or their non-transgenic littermates were sacrificed by cervical dislocation and ventricular tissue was removed, rinsed in cold PBS and homogenized using a Polytron at 10,000 rpm (3 x 15-s burst) in 500 μ l of ice-cold lysis buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM NaF, 2 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM

benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 5 mM DTT, and 1 µM microcystin LR. Homogenates were adjusted to 2% (v/v) with Triton X-100, rehomogenized by 20 passes using a 2.0 mL Potter-Elvehjem tissue grinder, and centrifuged for 30 minutes at 100,000 xg and 4°C. All samples were aliquoted, frozen using liquid nitrogen, and stored at -80°C.

Electrophoresis and immunoblotting. Lysates (20-100 µg) were diluted in SDS-PAGE sample buffer (final concentration: 300 mM sucrose, 2.5 % SDS, 0.5 M β-mercaptoethanol, 1mM EGTA, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.008% bromophenol blue), heated at 95°C for 5 minutes, and resolved on 7.5 % (RSK), 4-20% gradient (MCIP), or 10% (MEK, ERK, p38 MAPK) SDS-PAGE gels. Proteins were transferred (90 minutes at 70 V (100 V for p90-RSK), 4°C) onto nitrocellulose membranes in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol and 0.1% SDS. Membranes were blocked with 5% skimmed milk in TBS containing 0.1% Tween-20 (TBST) for 2 hours at room temperature, incubated overnight in a 5% BSA/TBST containing the indicated primary antibodies, washed (3 times, 7 min) with TBST, then incubated for 2 hours at room temperature with HRP-conjugated secondary antibody diluted in 5% skimmed milk/TBST. Membranes were re-washed as above. Immunoreactive bands were revealed by enhanced chemiluminescence (ECL, PerkinElmer Life Sciences, Inc) using BML or BMR film. Films were digitized using a flat-bed scanner, immunoreactive bands quantified with Quantity One Software (Version 4.5 for Mac, BioRad Laboratories), and results expressed relative immunoreactivity (pixel density (PD) x mm² x 10²).

Competitive RT-PCR (Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcriptase). Competitive reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR), conducted to quantify MKP-1, -2, and-3 mRNA, was performed as described previously (Wang et al. 1998). 10-14 and 34-40 week old transgenic mice or their non-transgenic littermates were sacrificed by cervical dislocation and ventricular tissues removed, trimmed and were

rinsed in PBS. Total cellular RNA was isolated in Tri reagent (Sigma) as described elsewhere (Grupp et al. 1998). To produce RNA mimics, for use as internal standards, total RNA was similarly isolated from rabbit ventricles, first-strand cDNA was reverse transcribed from rabbit ventricular total RNA, and used as a template for PCR amplification using chimeric primer pairs for MKP1 (sense : GGCCGCGGCGAGGCTATTGACTTCATAGACTCCACCGGGAGAAAATGACCCAG, antisense : TTCAGCAGAGCAGTGAGGGGCGATGAAGGAGGGCTGGAAC), MKP2 (sense : GGCCGCGGCCAGCACCAATGAGTCCTTGACCGGGAGAAAATGACCCAG, antisense : CGATGTACTCGATGGCTTCCAGATGAAGGAGGGCTGGAAC), and MKP3 (sense : GGCCGCGGGGCAAAAAGTGGTGTCTGGTGACCGGGAGAAAATGACCCAG, antisense : CCTGGTAGACGTTCTGGTTGGAGGGGATGAAGGAGGGCTGGAAC). The resulting products consist of fragments of rabbit cardiac α -actin flanked by a MKP gene-specific primer sense sequence at the 5' end and an antisense sequence at the 3' end. A second series of PCR reactions were performed with the T7 promoter sequence (AGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCGCGG) as a forward primer and reverse MKP gene-specific primers (MKP1: TTCAGCAGAGCAGTGAGGGGC, MKP2: CGATGTACTCGATGGCTTCCA, MKP3: CCTGGTAGACGTTCTGGTTGGAGGG). The resulting products were cDNA fragments with a T7 promoter followed by a forward MKP gene-specific primer, a rabbit cardiac α -actin fragment and then a reverse MKP gene-specific primer. The products were purified. RNA internal standards (mimics) were generated by in-vitro transcription with purified cDNA mimics as templates (mMESSAGE mMACHINE kit, Ambion). The remaining cDNA templates were digested using RNase-free DNase I (37°C, 30 minutes) and the RNA mimics recovered by phenol/chloroform extraction and isopropanol precipitation. For reverse transcription, a series of serial 10-fold dilutions (e.g., 20 ng/ml, 2 ng/ml, 200 pg/ml, 20 pg/ml and 2 pg/ml) of the RNA mimic were prepared and combined with 1 μ g of sample RNA. RNAs were denatured at 65°C for 5 minutes. RT was conducted in a 20 μ l reaction mixture containing 50 mM

Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 μg of random pd(N)₆ primer, 40 units of recombinant ribonuclease inhibitor (Invitrogen), and 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). First-strand cDNAs were synthesized at 37°C for 50 minutes and the enzyme was inactivated by heating at 70°C for 15 minutes. For PCR amplification, first-strand cDNA (5 μl) was used as an amplification template in a 50-μl reaction mixtures that included 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 mM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen). Reactions were started with an initial melt at 94°C for 3 minutes. The cycling profiles were 45 seconds of denaturing at 94°C, 30 seconds of annealing (55°C, 56°C, and 57°C, for MKP-1, -2 and -3 respectively), 90 seconds of elongation at 72°C for 35 cycles, followed by a final elongation step of 10 minutes at 72°C. The PCR products were resolved on 2% agarose gels containing 0.002% ethidium bromide, visualized, and bands quantified using Quantity One software (BioRad Laboratories). The mass of each amplified mimic and MKP mRNA fragment DNA was calculated from their fluorescence intensity using the DNA mass ladder to generate a standard curve of mass vs. fluorescence using a non-linear curve-fitting program (Prism 4.0b for Mac OSX, GraphPad Software) and extrapolating to zero.

Miscellaneous Methods. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (Bradford 1976) using bovine serum albumin as standard. Statistical analyses were performed using the program Prism (version 4.0b for Mac OSX, GraphPad Software).

Results

Activation of the ERK MAPK pathway in the ventricular myocardium by targeted over-expression of α_{1B} -AR. Previous studies of mice overexpressing the wild-type α_{1B} -AR under control of the α -myosin heavy chain promoter demonstrated that at 3 months the hearts are of normal size whereas at 9 months these animals display a dilated cardiomyopathic phenotype (Lemire et al. 2001). As α_{1B} -AR agonists are known to activate the ERK MAP kinase cascade, and this signalling pathway has been implicated in the hypertrophic response, we sought to determine if over-expression of wild-type α_{1B} ARs, which results in chronic activation of this signalling pathway, alters the activity of components of the ERK pathway. Both the phosphorylation and expression of ERK1 and ERK2 were examined by Western blot using anti-phospho-ERK and anti-total-ERK antibodies at 3 and 9 months in the ventricular myocardium of α_{1B} AR overexpressing mice (Tg3, Tg9) and their non-transgenic (nTg3, nTg9) littermates. As shown in Figure 1, ERK1 and ERK2 phosphorylation was elevated in α_{1B} AR overexpressing hearts, at both 3 and 9 months, compared with non-transgenic hearts (Fig. 1A,B). Interestingly, ERK1 phosphorylation was also significantly elevated at 9 mos, relative to 3 mos, in the transgenic hearts. In contrast, the expression levels of ERK1 and ERK2 were not significantly altered by either overexpression of α_{1B} ARs or age (Fig. 1C,D). ERK1/2 are phosphorylated, and thus become activated, by upstream protein kinases, MEK1/2. Hence, we next determined if MEK1/2 were activated in response to α_{1B} AR overexpression. As shown in Figure 2A, although increased, there was no significant change in MEK1/2 activation in the transgenic hearts at 3 months whereas in the Tg at 9 months, phosphorylation was significantly increased. Total MEK expression was unaffected (Fig. 2B). Finally, the phosphorylation level of p90 ribosomal S6 kinase (p90^{rsk}), a downstream protein kinase that is phosphorylated by activated ERK1/2, was assessed. Phosphorylation of p90^{rsk} was increased in the α_{1B} AR overexpressing hearts at both 3 and 9 months (Fig. 3). In addition, as with ERK1, there was an age-dependent

increase in p90^{rsk} phosphorylation. Therefore, myocyte-selective overexpression of the wild-type α_{1B} -AR resulted in chronic activation of the ERK MAPK pathway.

MKPs expression levels are altered with age and/or over-expression of α_{1B} -AR. MAP kinases are activated by phosphorylation and inactivated by dephosphorylation. Phosphoprotein phosphatases that dephosphorylate MAP kinases include the MAP kinase phosphatases (MKPs) and the activity of the MKPs is regulated primarily at the level of transcription. We initially attempted to compare the protein levels of MKP1, MKP2 and MKP3 in ventricular myocardium of non-transgenic and α_{1B} -AR overexpressing hearts by immunoblotting; however, the existing commercially available antisera lacked sufficient specificity to provide useful data. Therefore, we quantified MKP1, MKP2 and MKP3 expression at the mRNA level using competitive RT-PCR. Although there was a trend for MKP1 expression to increase in α_{1B} -AR overexpressing hearts, this did not reach significance: however, the mRNA levels for MKP1 decreased significantly with age in both in transgenic and control hearts (Fig. 4A). ERK is not an ideal substrate for MKP1 but under certain conditions, it can be dephosphorylated. This phosphatase shows greater specificity towards p38 MAPKs. ERK and JNK are good substrates for MKP2 and the mRNA level of this phosphatase was decreased in α_{1B} -AR overexpressing hearts and in both control and transgenic hearts at 9 months in comparison with the levels in the 3 month control ventricle (Fig. 4B). However, at 9 mos MKP2 mRNA levels did not differ significantly between control and α_{1B} -AR overexpressing hearts. Finally, the expression of MKP3, an MKP activity that is specific for ERK, was examined. Ventricular expression of MKP3 was unaffected at 3 or 9 mos by α_{1B} -AR overexpression (Fig. 4C) whereas MKP3 mRNA was decreased at 9 months relative to 3 months, suggesting an age-dependant regulation. α_{1B} -AR overexpressing hearts showed a trend towards reduced MPK3 expression that did not reach significance.

MCIP 1 expression level is increased by α_{1B} -AR over-expression. Calcineurin, a Ca^{2+} - and calmodulin-dependent serine/threonine protein phosphatase, is thought to play an important role in transducing signals arising from hypertrophic stimuli (see (Olson and Williams 2000a; Olson and Williams 2000b)). Furthermore, treatment of cardiac myocytes with cyclosporin A, an inhibitor of calcineurin activity, prevents hypertrophy in response to PE (Molkentin et al. 1998). As overexpression of α_{1B} -AR leads to hypertrophy (Lemire et al. 2001), chronic activation of α_{1B} -AR signalling through overexpression may result in increased calcineurin activity. Modulatory calcineurin-interacting proteins (MCIPs) bind to and inhibit calcineurin (Rothermel et al. 2000), and calcineurin both activated *MCIP1* transcription and stabilized the MCIP1 protein (see (Rothermel et al. 2003)). Hence, to determine if calcineurin activity was increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts MCIP-1 levels were assessed by Western blot. As shown in figure 5, α_{1B} -AR overexpressing hearts contained 3-fold higher amounts of MCIP-1 at both 3 and 9 mos, indicating chronic elevated levels of calcineurin activity.

Discussion

Overexpression of constitutively active α_{1B} -AR under the control of α -MHC promoter, which provides for cardiac-specific expression of the transgene, leads to mild cardiac hypertrophy characterized by increases in heart-to-body weight, myocyte cross-sectional area, and ANF expression within 10 weeks (Milano et al. 1994). On the other hand, overexpression of wild-type α_{1B} -AR under the control of α -MHC promoter induces a late-onset dilated cardiomyopathy (Lemire et al. 2001). PE activates the ERK MAP kinase cascade and chronic exposure to PE promotes hypertrophy. As PE -induced activation of the ERK cascade appears to be mediated primarily by the α_{1B} -AR subtype (Wenham et al. 1997) the present study was to determine if chronic α_{1B} -AR stimulation resulted in sustained activation of the ERK MAP kinase pathway. Phosphorylation of MEK, ERK, and p90^{rsk} were increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts. MEK phosphorylation was significantly elevated at 9 mo (Fig. 2), whereas ERK (Fig. 1) and p90^{rsk} (Fig. 3) phosphorylation was elevated at 3 and 9 mo. Thus, the ERK pathway was activated in a sustained manner and remained activated at 9 months. As these animals display a progressive decrease of LV function, chamber dilatation and genetic reprogramming, resembling features of idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) in human, die prematurely at middle age (~ 9 months) with signs of heart failure (Lemire et al. 2001). Thus, prolonged activation of the ERK cascade may play a role in mediating the hypertrophic response.

The ERK pathway regulates the activity of several transcription factors and hence induce the expression of various genes including those encoding the MKPs. MKPs are dual-specificity phosphatases that dephosphorylate the critical threonine and tyrosine residues of MAPKs, resulting in their inactivation (Neel and Tonks 1997). As MKPs are activated by the presence of substrate, regulation is at the level of transcription. To determine if α_{1B} -AR overexpression and ERK activation were accompanied by a compensatory increase in MKP expression, MKP-1, -2, and -3 mRNAs were quantified

in the ventricular myocardium. MKP1 mRNA content was reduced at 9 months, both in α_{1B} -AR overexpressing and nontransgenic hearts, suggesting an age-dependant rather than a transgene-mediated effect. MKP1, which blocks the hypertrophic response induced by ET-1, PE or phorbol ester (Fuller et al. 1997), preferentially dephosphorylates p38 and JNK over ERK. However, MKP1 may also dephosphorylate ERK under certain circumstances (Camps et al. 2000; Keyse 2000; Steinmetz et al. 2004). MKP2 shows similar specificity towards JNK, p38, and ERK. At 3 mo, α_{1B} -AR overexpressing hearts contained less MKP2 mRNA with respect to nontransgenic hearts. MKP2 mRNA was also reduced in non-transgenic, but not transgenic, hearts at 9 mo. The decreased expression of MKP2 in transgenic hearts at 3 months was consistent with the increased ERK phosphorylation detected at this age; however, at 9 months both ERK phosphorylation and MKP2 mRNA were increased. These data suggest that MKP2 may not have a significant role in the development of the cardiomyopathy and/or that other pathways may be more important. Finally, MKP3 preferentially binds to and regulates ERK (Farooq and Zhou 2004). MKP3 mRNA content was down regulated at 9 months, both in transgenic and control hearts, more suggestive of an age-dependant down regulation. In each case, MKP expression appeared to be reduced with age whereas ERK phosphorylation was unchanged. This lack of change was not accompanied by a compensatory reduction in MEK phosphorylation; hence, there may be an age-dependent shift in the phosphatase activities responsible for regulating ERK activity. Increases in ERK phosphorylation were equivalent to increased ERK activity, as phosphorylation of the downstream kinase p90^{rsk} was generally consistent with changes in ERK phosphorylation. In contrast, in human striated muscle biopsies, MKP1 protein levels increased with age, as did phosphorylation of ERK and p90^{rsk}, and whereas exercise increased ERK phosphorylation in young subjects, phosphorylation was reduced in elderly subjects in response to exercise (Williamson et al. 2003). Hence, the regulation,

and possibly the function, of the ERK cascade may undergo significant changes during aging.

Activation of the Ca^{2+} - and calmodulin-dependent serine/threonine phosphatase calcineurin has been implicated in pathological (Molkentin et al. 1998; Molkentin 2004; Olson and Williams 2000a), and possibly normal developmental and exercise-induced (De Windt et al. 2001; Rothermel et al. 2001), hypertrophy. The role of the calcineurin pathway in hypertrophy has been controversial. Cyclosporin A inhibits calcineurin activity and blocks hypertrophy secondary to transgenic overexpression of activated calsequestrin (Molkentin et al. 1998); however, occasionally patients on chronic immunosuppressive therapy with cyclosporin A develop hypertrophy secondary renal toxicity and hypertension (Lipkin et al. 1993). When activated, calcineurin dephosphorylates members of the nuclear factor of activated T-cell (NF-AT) family of transcription factors in the cytosol, permitting them to translocate to the nucleus. One in the nucleus, NF-AT up regulates the expression of various target genes, including the *MCIP1* gene (Yang et al. 2000), and transgenic mice with cardiac-directed overexpression of activated NF-AT3 also develop hypertrophy (Molkentin et al. 1998). *MCIP1* binds to and inhibits the catalytic domain of calcineurin (Rothermel et al. 2000). In addition, when bound to activated calcineurin, the half-life of *MCIP1* is prolonged (Rothermel et al. 2003). Hence, *MCIP1* and calcineurin are involved in a complicated negative feedback loop and *MCIP1* expression reflects directly the phosphatase activity of calcineurin. In addition, ERK activity is associated with increased calcineurin/NF-AT signalling (see (Molkentin 2004)). Since mice overexpressing α_{1B} -AR develop mild hypertrophy, calcineurin activation may be involved. In α_{1B} -AR overexpressing hearts *MCIP1* expression was increased both at 3 and 9 months, suggesting that calcineurin activity was increased. However, although *MCIP1* was similarly elevated at 3 and 9 mo, mice overexpressing the wild type α_{1B} -AR developed a late-onset dilated cardiomyopathy. One possible explanation for this is that increased *MCIP1* expression

delayed the onset and progression of hypertrophy in wild type α_{1B} -AR overexpressing hearts as MCIP1 overexpression prevents or reduces hypertrophy resulting from diverse hypertrophic stimuli (Rothermel et al. 2001; van Rooij et al. 2004; Vega et al. 2003).

Acknowledgements

We thank Dominique Chevalier and Aida Marie Mamarbachi for technical assistance. This work was supported by grants from the Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal (FRICM) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to both HR and BGA (MT-14725). BGA and HR were New Investigators of the Heart and Stroke Foundation of Canada. BGA is currently a Senior Scientist of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

References

Adams, J.W., Sah, V.P., Henderson, S.A., and Brown, J.H. 1998. Tyrosine kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase mediate hypertrophic responses to prostaglandin F₂α in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **83**: 167-178.

Aoki, H., Richmond, M., Izumo, S., and Sadoshima, J. 2000. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Biochem. J.* **347**: 275-284.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Bush, E., Fielitz, J., Melvin, L., Martinez-Arnold, M., Mckinsey, T.B., Plichta, R., and Olson, E.N. 2004. A small molecular activator of cardiac hypertrophy uncovered in a chemical screen for modifiers of the calcineurin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2870-2875.

Camps, M., Nichols, A., and Arkininstall, S. 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* **14**: 6-16.

Chalothorn, D., Mccune, D.F., Edelmann, S.E., Garcia-Cazarin, M.L., Tsujimoto, G., and Piascik, M.T. 2002. Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha₁-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* **61**: 1008-1016.

Clerk, A., Gillespie-Brown, J., Fuller, S.J., and Sugden, P.H. 1996. Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, protein kinase C translocation, and mitogen-activated protein kinase activity by bradykinin in rat ventricular myocytes: dissociation from the hypertrophic response. *Biochem. J.* **317**: 109-118.

De Windt, L.J., Lim, H.W., Bueno, O.F., Liang, Q., Delling, U., Braz, J.C., Glascock, B.J., Kimball, T.F., Del Monte, F., Hajjar, R.J., and Molkenin, J.D. 2001. Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 3322-3327.

Farooq, A., and Zhou, M.M. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell. Signal.* **16**: 769-779.

Fedida, D., Braun, A.P., and Giles, W.R. 1993. Alpha 1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiol. Rev.* **73**: 469-487.

Fuller, S.J., Davies, E.L., Gillespie-Brown, J., Sun, H., and Tonks, N.K. 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes. *Biochem. J.* **323**: 313-319.

Gillespie-Brown, J., Fuller, S.J., Bogoyevitch, M.A., Cowley, S., and Sugden, P.H. 1995. The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **270**: 28092-28096.

Glennon, P.E., Kaddoura, S., Sale, E.M., Sale, G.J., Fuller, S.J., and Sugden, P.H. 1996. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **78**: 954-961.

Grupp, I.L., Lorenz, J.N., Walsh, R.A., Boivin, G.P., and Rindt, H. 1998. Overexpression of α_{1B} -adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **275**: H1338-H1350.

Harris, I.S., Zhang, S., Treskov, I., Kovacs, A., Weinheimer, C., and Muslin, A.J. 2004. Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* **110**: 718-723.

Keyse, S.M. 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 186-192.

Knowlton, K.U., Michel, M.C., Itani, M., Shubeita, H.E., Ishihara, K., Brown, J.H., and Chien, K.R. 1993. The α_{1A} -adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **268**: 15374-15380.

Lemire, I., Allen, B.G., Rindt, H., and Hébert, T.E. 1998. Cardiac-specific overexpression of α_{1B} AR regulates β AR activity via molecular crosstalk. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**: 1827-1839.

Lemire, I., Ducharme, A., Poulin, F., Tardif, J.-C., Jones, L.R., Allen, B.G., Hébert, T.E., and Rindt, H. 2001. Cardiac-directed overexpression of wild type α_{1B} -AR induces dilated cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* **281**: H931-H938.

Lipkin, G.W., Tucker, B., Giles, M., and Raine, A.E. 1993. Ambulatory blood pressure and left ventricular mass in cyclosporin- and non-cyclosporin-treated renal transplant recipients. *J. Hypertens.* **11**: 439-442.

Meidell, R.S., Sen, A., Henderson, S.A., Slahetka, M.F., and Chien, K.R. 1986. Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am. J. Physiol.* **251**: H1076-H1084.

Michel, M.C., Hanft, G., and Gross, G. 1994. Radioligand binding studies of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **111**: 533-538.

Milano, C.A., Dolber, P.C., Rockman, H.A., Bond, R.A., Venable, M.E., Allen, L.F., and Lefkowitz, R.J. 1994. Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10109-10113.

Minneman, K.P., and Esbenshade, T.A. 1994. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**: 117-133.

Minneman, K.P., Theroux, T.L., Hollinger, S., Han, C., and Esbenshade, T.A. 1994. Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **46**: 929-936.

Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**: 215-228.

Molkentin, J.D. 2004. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.* **63**: 467-475.

Neel, B.G., and Tonks, N.K. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 193-204.

Nemoto, S., Sheng, Z., and Lin, A. 1998. Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3518-3526.

O'connell, T.D., Ishizaka, S., Nakamura, A., Swigart, P.M., Rodrigo, M.C., Simpson, G.L., Cotecchia, S., Rokosh, D.G., Grossman, W., Foster, E., and Simpson, P.C. 2003. The α_{1AC} - and α_{1B} -adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J. Clin. Invest.* **111**: 1783-1791.

Olson, E.N., and Williams, R.S. 2000a. Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**: 689-692.

Olson, E.N., and Williams, R.S. 2000b. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* **22**: 510-519.

Post, G.R., Goldstein, D., Thuerlauf, D.J., Glembotski, C.C., and Brown, J.H. 1996. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 8452-8457.

Rokosh, D.G., Stewart, A.F., Chang, K.C., Bailey, B.A., Karliner, J.S., Camacho, S.A., Long, C.S., and Simpson, P.C. 1996. α_1 -Adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by α_1 -adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and *in vivo*. Repression of α_{1B} and α_{1D} but induction of α_{1C} . *J. Biol. Chem.* **271**: 5839-5843.

Rothermel, B., Vega, R.B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* **275**: 8719-8725.

Rothermel, B.A., Mckinsey, T.A., Vega, R.B., Nicol, R.L., Mammem, P., Yang, J., Antos, C.L., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., and Williams, R.S. 2001. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 3328-3333.

Rothermel, B.A., Vega, R.B., and Williams, R.S. 2003. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**: 15-21.

Schreckenber, R., Taimor, G., Piper, H.M., and Schluter, K.D. 2004. Inhibition of Ca²⁺-dependent PKC isoforms unmasks ERK-dependent hypertrophic growth evoked by phenylephrine in adult ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **63**: 553-560.

Sheng, Z., Knowlton, K., Chen, J., Hoshijima, M., Brown, J.H., and Chien, K.R. 1997. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **272**.

Silberbach, M., Gorenc, T., Hershberger, R.E., Stork, P.J., Steyger, P.S., and Roberts, C.T., Jr. 1999. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 24858-24864.

Simpson, P. 1983. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha₁-adrenergic response. *J. Clin. Invest.* **72**: 732-738.

Simpson, P. 1985. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha₁-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha₁- and beta₁-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ. Res.* **56**: 884-894.

Steinmetz, R., Wagoner, H.A., Zeng, P., Hammond, J.R., Hannon, T.S., Meyers, J.L., and Pescovitz, O.H. 2004. Mechanisms Regulating the Constitutive Activation of the ERK Signaling Pathway in Ovarian Cancer and the Effect of RNAi for ERK1/2 on Cancer Cell Proliferation. *Mol. Endocrinol.* **Jul 8** [Epub ahead of print].

Stewart, A.F., Rokosh, D.G., Bailey, B.A., Karns, L.R., Chang, K.C., Long, C.S., Kariya, K., and Simpson, P.C. 1994. Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* **75**: 796-802.

Thorburn, J., Frost, J.A., and Thorburn, A. 1994. Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. *J. Cell. Biol.* **126**: 1565-1572.

Ueyama, T., Kawashima, S., Sakoda, T., Rikitake, Y., Ishida, T., Kawai, M., Yamashita, T., Ishido, S., Hotta, H., and M., Y. 2000. Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 947-960.

Van Rooij, E., Doevendans, P.A., Crijns, H.J.G.M., Heeneman, S., Lips, D.J., Van Bilsen, M., Williams, R.S., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., Rothermel, B.A., and De Windt, L.J. 2004. MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ. Res.* **94**: e18-e26.

Vecchione, C., Fratta, L., Rizzoni, D., Notte, A., Poulet, R., Porteri, E., Frati, G., Guelfi, D., Trimarco, V., Mulvany, M.J., Agabiti-Rosei, E., Trimarco, B., Cotecchia, S., and Lembo, G. 2002. Cardiovascular influences of alpha1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation* **105**: 1700-1707.

Vega, R.B., Rothermel, B.A., Weinheimer, C.J., Kovacs, A., Naseem, R.H., Bassel-Duby, R., Williams, R.S., and Olson, E.N. 2003. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 669-674.

Wang, Z., Yue, L., White, M., Pelletier, G., and Nattel, S. 1998. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* **98**: 2422-2428.

Wenham, D., Rahmatullah, R.J., Rahmatullah, M., Hansen, C.A., and Robishaw, J.D. 1997. Differential coupling of α_1 -adrenoreceptor subtypes to phospholipase C and mitogen activated protein kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **339**: 77-86.

Williamson, D., Gallagher, P., Harber, M., Hollon, C., and Trappe, S. 2003. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J. Physiol.* **547**: 977-987.

Yang, J., Rothermel, B., Vega, R.B., Frey, N., Mckinsey, T.A., Olson, E.N., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ. Res.* **87**, e61-e68.

Zhong, H., and Minneman, K.P. 1999. α_1 -Adrenergic subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **375**: 261-276.

Zuscik, M.J., Chalothorn, D., Hellard, D., Deighan, C., Mcgee, A., Daly, C.J., Waugh, D.J., Ross, S.A., Gaivin, R.J., Morehead, A.J., Thomas, J.D., Plow, E.F., Mcgrath, J.C., Piasek, M.T., and Perez, D.M. 2001. Hypotension, autonomic failure, and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **276**: 13738-13743.

Legends

Figure 1: ERK1/2 phosphorylation is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts. Hearts from transgenic mice (Tg) and age-matched non-transgenic littermates (nTg) were homogenized in lysis buffer and 75 μ g of the lysates were loaded on 10% SDS-PAGE gels. After electrophoretic transfer, the samples were probed with an anti-phospho-ERK1/2 (A, B). Filters were subsequently stripped and reprobbed with antisera to total ERK1 and ERK2 (C, D). Films were digitized using a flat-bed scanner, immunoreactive bands quantified with Quantity One Software (Version 4.5 for Mac OSX, BioRad Laboratories), and results expressed as relative immunoreactivity (pixel density \times mm² \times 10²). The results shown are mean \pm S.E. of 6 transgenic and 5-6 non-transgenic hearts at 3 months (nTg 3, Tg 3) and 9 months (nTg 9, Tg 9). * $p < 0.05$ vs. nTg 3; ** $p < 0.05$ vs. Tg 3; ‡ $p < 0.05$ vs. nTg 9 (Student's *t* test).

Figure 2: MEK1/2 phosphorylation is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts. Hearts from transgenic mice (Tg) and age-matched non-transgenic littermates (nTg) were homogenized in lysis buffer and 75 μ g of the lysates were loaded on 10% SDS-PAGE gels. After electrophoretic transfer, the samples were probed with an anti-phospho-MEK1/2 antibody (A). Filters were subsequently stripped and reprobbed with antisera to total MEK (B). Films were digitized using a flat-bed scanner, immunoreactive bands quantified with Quantity One Software (Version 4.5 for Mac, BioRad Laboratories), and results expressed as relative immunoreactivity (pixel density \times mm² \times 10²). Results shown are mean \pm S.E. of 6 transgenic (Tg) and 5-6 non-transgenic (nTg) hearts at 3 (nTg 3, Tg 3) and 9 months (nTg 9, Tg 9). ‡ $p < 0.05$ vs. nTg 9 (Student's *t* test).

Figure 3: p90^{rsk} phosphorylation is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts. Hearts from transgenic mice (Tg) and age-matched non-transgenic littermates (nTg) were homogenized in lysis buffer and 75 μ g of the lysates were loaded on 7.5% SDS-PAGE

gels. After electrophoretic transfer, the samples were probed with an anti-phospho-p90^{rsk} antibody. Films were digitized using a flat-bed scanner, immunoreactive bands quantified with Quantity One Software (Version 4.5 for Mac, BioRad Laboratories), and results expressed relative as immunoreactivity (pixel density x mm² x 10²). Results shown are mean ± S.E. of 6 transgenic and 5-6 non-transgenic hearts at 3 months (nTg 3, Tg 3) and 9 months (nTg 9, Tg 9). * $p < 0.05$ vs. nTg 3; ** $p < 0.05$ vs. Tg 3; ‡ $p < 0.05$ vs. nTg 9 (Student's *t* test).

Figure 4: Expression of MKP-1, -2 and -3 are altered with age and/or overexpression of the α_{1B} -AR. Total RNA was isolated from the ventricular myocardium of 3 and 9 mo transgenic mice (Tg) and age-matched non-transgenic littermates (nTg). MKP -1, -2 and -3 mRNAs were quantified by competitive RT-PCR as described under "Methods". The products of RT-PCR were separated on 2% agarose gels, quantified under UV light using ethidium bromide staining and a NightHawk imaging system, and analyzed using Quantity One software (BioRad Laboratories). The amount of MKP-1 (A), -2 (B), and -3 (C) mRNA is expressed as amol/ μ g total RNA. Data represents the mean ± S.E. of 3 separate experiments employing 3 separate hearts. * $p < 0.05$ vs. nTg 3; ** $p < 0.05$ vs. Tg 3.

Figure 5: Expression of MCIP is increased in α_{1B} -AR overexpressing hearts. Hearts from transgenic mice (Tg) and age-matched non-transgenic littermates (nTg) were homogenized in lysis buffer and 20 μ g of the lysate were loaded on 4-20% acrylamide-gradient SDS-PAGE mini-gels (Invitrogen). After electrophoretic transfer, the samples were probed with an anti-MCIP antibody. Immunoreactive bands were digitized, quantified and normalized to IP90/calnexin immunoreactivity. Results shown are mean ± S.E. of 4 transgenic and 4 non-transgenic hearts at 3 months (nTg 3, Tg 3) and 9 months (nTg 9, Tg 9). * $p < 0.05$ vs. nTg 3; ‡ $p < 0.05$ vs. nTg 9 (Student's *t* test).

Figure 1.

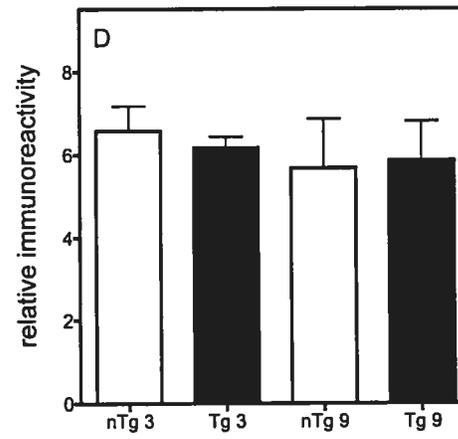
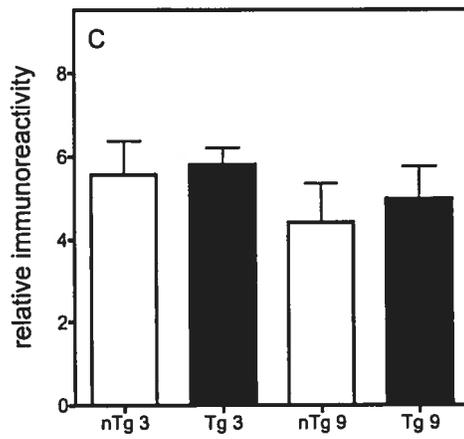
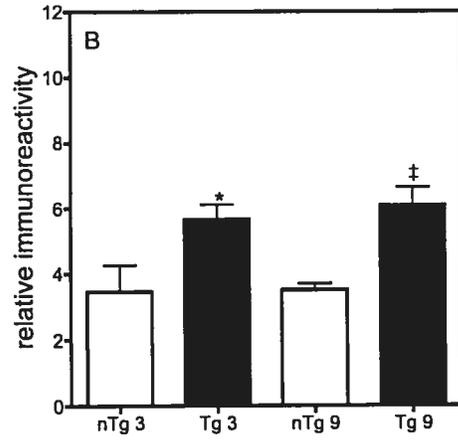
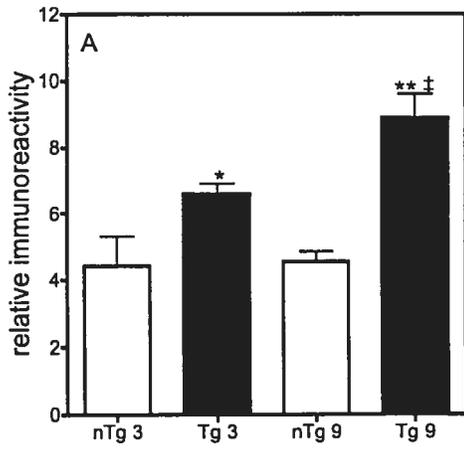


Figure 2.

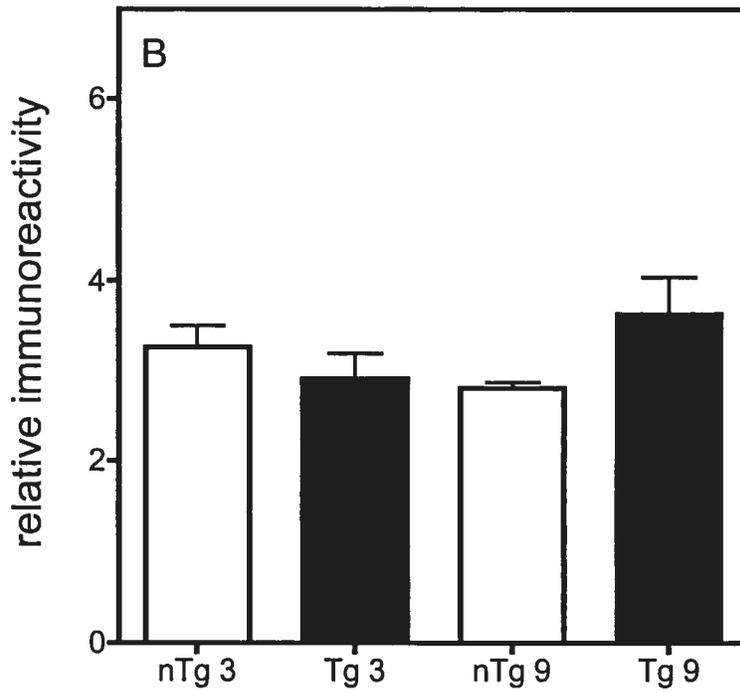
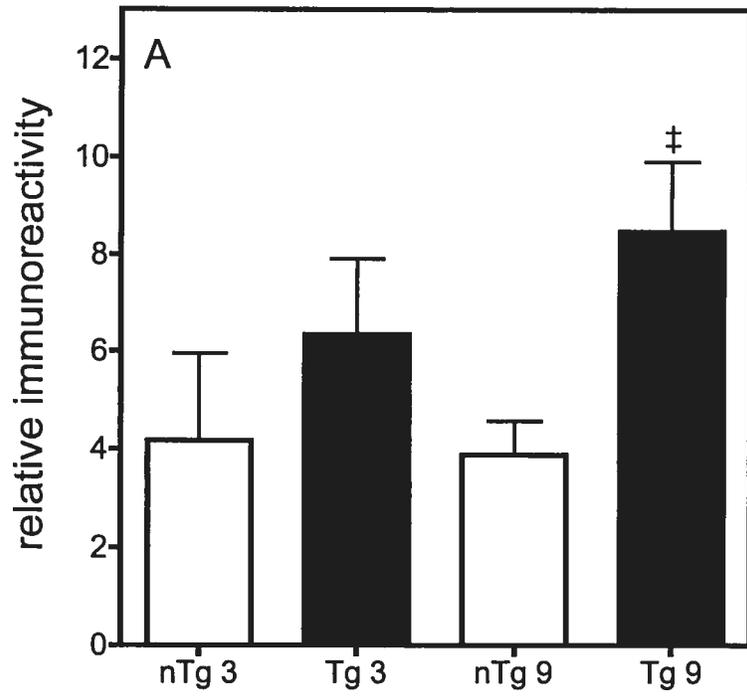


Figure 3.

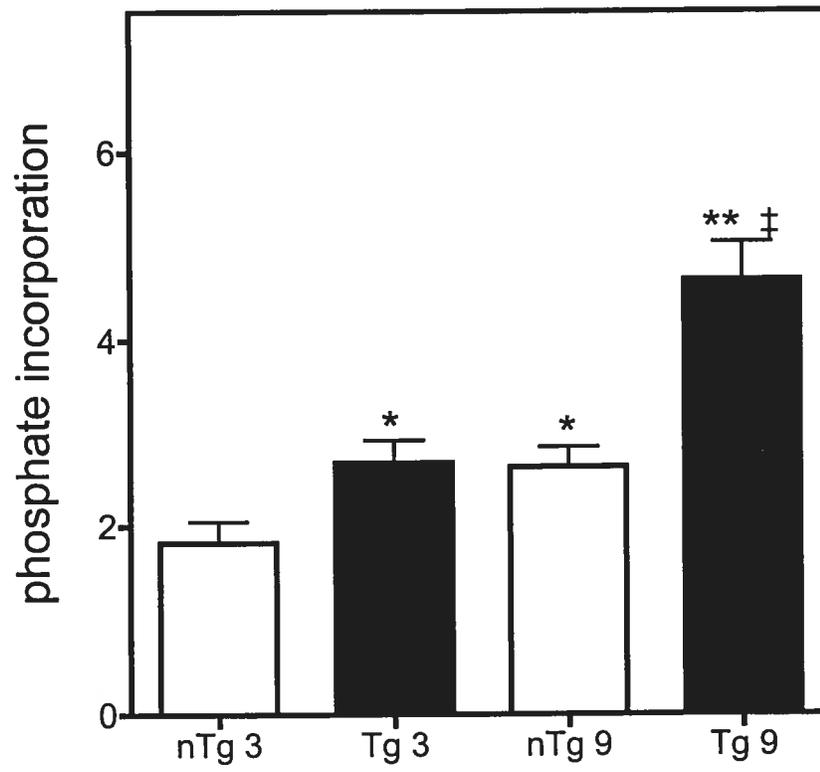


Figure 4.

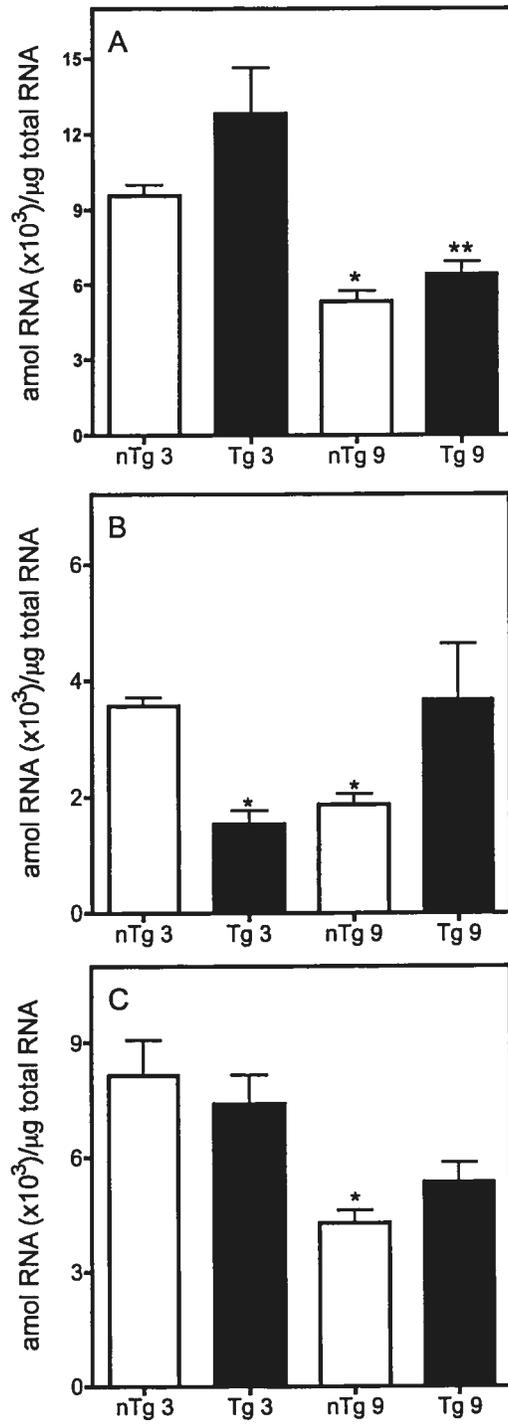
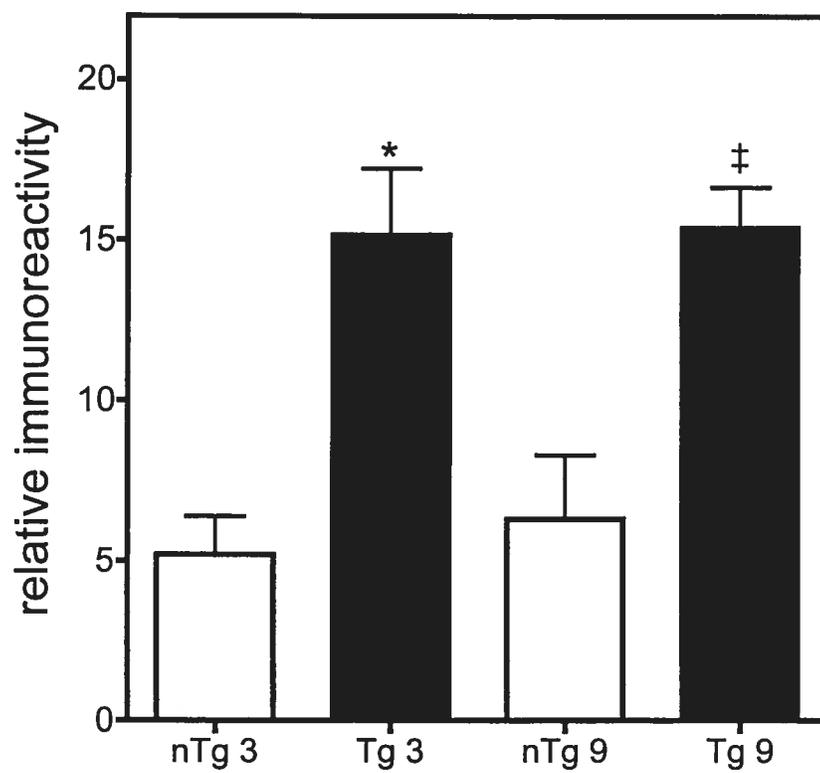


Figure 5.



CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE

5 Le α_{1B} -AR dans le cœur

5.1 Signalisation induite par le α_{1B} -AR dans le cœur

Les α_1 -AR ont des rôles importants dans la physiologie normale et dans plusieurs pathologies, notamment dans l'hypertrophie et la défaillance cardiaques. La distribution, les propriétés de liaison, les voies de signalisation et les mécanismes de régulation pour les différents sous-types de α_1 -AR constituent des cibles intéressantes lors de l'établissement d'une thérapie pharmacologique spécifique.

Tel que mentionné précédemment, la stimulation chronique des récepteurs α_1 -adrénergiques couplés à Gq mène souvent à un phénotype hypertrophique des cardiomyocytes, caractérisé par une augmentation de la synthèse protéique, une ré-organisation des myofibres et une ré-expression de gènes fœtaux. Les voies de signalisation proposées sont complexes et impliqueraient, entre autres, l'activation des kinases ERK, PI3K, PKC, la petite protéine G Ras et la phosphatase calcineurine (14,17,18,20,26,60). Par exemple, dans les myocytes ventriculaires de rat adulte (ARVM), la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques active ERK, MEK, Ras et Raf, ainsi que la synthèse protéique, mais les voies p38 MAPK et JNK ne sont pas activées (18). De plus, McWhinney et al. (26) ont montré l'activation de ERK *in vitro*, via la stimulation du α_{1B} -AR.

Le modèle murin utilisé dans cette étude surexprimait le récepteur α_{1B} -adrénergique de type sauvage dans le cœur. Grâce à une densité de récepteurs environ 150 fois celle physiologique, une signalisation en aval du récepteur est obtenue puisqu'un faible pourcentage de récepteurs s'active spontanément, permettant ainsi la signalisation même en absence d'agoniste. Nous avons voulu vérifier l'activité des voies de ERK et de

p38 MAPK *in vivo*. Des immunobuvardages de type western nous ont permis de mesurer le niveau d'activation de ces voies. De plus, comme l'activité des phosphatases est importante pour la régulation de l'activité des kinases, nous avons quantifié l'expression de 3 phosphatases de MAPK, MKP1-3, et de MCIP1, une protéine inhibitrice de la calcineurine, une phosphatase à Ser/Thr.

Tel que décrit dans l'article qui constitue le chapitre 4 de ce mémoire, nous avons observé que la voie de ERK était plus activée chez les souris transgéniques de 9 mois, au niveau de MEK, ERK et p90^{RSK}, comparativement aux nTg de 3 mois. Toutefois, à 3 mois, seul ERK était activé chez les souris transgéniques. De plus, des essais kinase nous ont permis de suggérer que l'activité kinase de Raf-1 tendait à être augmentée chez les Tg de 3 et 9 mois, mais le changement n'était pas significatif (résultats non montrés), peut-être parce qu'il y a amplification du signal plus en aval. Pour ce qui est de la kinase p38 MAPK, son activité était augmentée à 9 mois chez les Tg et les nTg, comparativement à celle observée chez les nTg de 3 mois. De plus, à 9 mois, son niveau de phosphorylation était diminué chez les Tg comparativement aux nTg. Les résultats pour p38 MAPK n'ont pas été publiés et sont présentés dans la section 5.3.3 de ce mémoire.

Puisque l'activité des phosphatases est régulée principalement au niveau de l'expression, nous avons quantifié les ARNm de MKP1, MKP2 et MKP3, 3 phosphatases à double-spécificité pour les MAPK. Nous avons observé que l'expression de MKP1 et 3 étaient diminuées chez les souris Tg et nTg de 9 mois. L'expression de MKP2 était diminuée chez les Tg de 3 mois et les nTg de 9 mois. Finalement, nous avons vérifié l'expression de MCIP1, une protéine inhibitrice de la calcineurine. Le niveau d'expression de MCIP1 donne une indication directe du niveau d'activation de la

calcineurine, une phosphatase impliquée dans l'hypertrophie cardiaque. Des immunobuvardages de type western nous ont permis de voir que, chez les Tg de 3 et 9 mois, l'expression de MCIP1 était augmentée comparativement aux nTg. Ceci suggère que la calcineurine était plus activée chez les transgéniques. Cependant, puisqu'une faible expression de MCIP1 stabilise la calcineurine mais qu'une forte expression est inhibitrice, nous ne pouvons conclure si la calcineurine était inhibée ou stabilisée par MCIP1. Ces résultats suggèrent que la calcineurine et la voie de ERK étaient peut-être impliquées dans le développement de la cardiomyopathie, contrairement à la voie de p38 MAPK.

Changement dépendant du transgène (à âge comparable)		Changement dépendant de l'âge (à transgène comparable)	
À 3 mois	À 9 mois	À 3 mois	À 9 mois
↑ phosphorylation ERK chez les Tg	↑ phosphorylation ERK chez les Tg		↑ phosphorylation ERK chez les Tg
↑ phosphorylation p90 ^{RSK} chez les Tg	↑ phosphorylation MEK chez les Tg		↑ phosphorylation p90 ^{RSK} chez les nTg
↓ expression de MKP2 chez les Tg	↑ phosphorylation p90 ^{RSK} chez les Tg		↑ phosphorylation p90 ^{RSK} chez les Tg
↑ expression de MCIP1 chez les Tg	↑ expression de MCIP1 chez les Tg		↓ expression de MKP1 chez les Tg
↑ phosphorylation p38 MAPK chez les Tg			↓ expression de MKP1 chez les nTg
			↓ expression de MKP2 chez les nTg
			↓ expression de MKP3 chez les nTg
			↑ expression de MCIP1 chez les Tg
			↑ phosphorylation p38 MAPK chez les nTg

Tableau 2 : Changements dépendants du transgène et/ou de l'âge observés dans la présente étude.

Chez les souris transgéniques de 3 mois, ERK et la calcineurine sont activés. Une activation de ces 2 protéines est un signe d'hypertrophie cardiaque. Cependant, le seul signe d'hypertrophie observé est l'augmentation de l'ANF. Cependant, chez les souris transgéniques de 9 mois (sans défaillance cardiaque), des signes de dilatation et de défaillance cardiaques sont observés. Quel est le point de transition entre ces deux états, y a-t-il des changements observés dans le cœur sain vieillissant? D'une manière générale, une diminution du nombre de cardiomyocytes est observée avec l'âge (81). De plus, la quantité de noradrénaline sanguine chez les humains âgés est supérieure à celle observée chez les jeunes (82,83). Ceci est peut-être causé par la plus forte activité sympathique avec l'âge (83).

De plus, d'autres études ont montré une augmentation de la protéine Gi dans le cœur de rat sain vieillissant (10,84,85), mais une diminution de la protéine Gs (10). Il a aussi été montré que la protéine Gi augmente dans le cœur défaillant et dans le cœur hypertrophié (86-89). Il a aussi été observé qu'il y a une diminution de la densité des récepteurs β -AR cardiaques et de leur réponse dans le cœur vieillissant, autant chez l'humain (10,90) que chez les rongeurs (90). Au niveau moléculaire, il y a diminution de l'activité de l'AC (10,85,90); au niveau du cœur entier, il y a diminution de la fréquence cardiaque et de la fraction d'éjection (90). Finalement, il a été montré qu'il y a diminution du nombre total de α_1 -AR dans le cœur de rat vieillissant (91,92). Les sous-types α_{1A} -AR et α_{1B} -AR sont les plus abondants dans le myocarde de rat sain. Chez le rat vieillissant, il y a une petite augmentation de leur densité et une petite diminution de celle des α_{1D} -AR. Cependant, ces différences ne sont pas significatives (93). Il a aussi été démontré que dans le cœur humain défaillant, il y a augmentation de la quantité de α_1 -AR (83).

Dans le présent chapitre, nous allons faire un retour critique sur les résultats que nous avons obtenus. Nous allons aussi tenter d'établir un lien entre nos données et celles de la littérature concernant le développement de la défaillance cardiaque de ces souris.

5.2 Surexpression du α_{1B} -AR actif, de Gq et de Ras, et l'hypertrophie cardiaque

Plusieurs études ont utilisé un modèle de souris transgénique surexprimant le récepteur α_{1B} -adrénergique actif de façon constitutive afin d'identifier la signalisation intracellulaire en aval de ce récepteur. Milano et al. (23) ont montré que, *in vivo*, la PLC est activée et une hypertrophie cardiaque est observée : il y a une augmentation du ratio poids du cœur/poids du corps, de l'aire transversale des myocytes et de l'expression de l'ANF. Zuscik et al. (24) ont montré une augmentation du ratio poids du cœur/poids du corps, indiqué par une augmentation de l'épaisseur de la paroi postérieure et du septum. Cependant, aucune augmentation de l'expression de l'ANF n'a été détectée, suggérant que la progression de l'hypertrophie cardiaque ne soit pas toujours associée à l'augmentation de l'expression de l'ANF et/ou de gènes fœtaux (13,18,24). De plus, les mutations activatrices du récepteur ne sont pas les mêmes, ce qui pourrait affecter le niveau d'activité du récepteur, la signalisation activée par la liaison à différentes protéines G, etc.

Hunter et al. (94) ont montré que la surexpression de Ras entraîne une augmentation de la masse du ventricule gauche et de l'expression de l'ANF. De plus, un désalignement des myofibres et une perte de fonction diastolique sont observés. Ainsi, la surexpression de Ras est suffisante pour induire l'hypertrophie et la défaillance cardiaques. Il a aussi été montré que la surexpression de Gq dans le cœur de souris

entraîne une hypertrophie cardiaque définie par l'expression de gènes fœtaux (ANF, β -MHC, α -actine squelettique), une augmentation du ratio poids du cœur/poids du corps et de la taille des myocytes (95). De plus, cette hypertrophie compromet sévèrement la fonction systolique cardiaque. Une forte expression de Gq résulte en une cardiomyopathie dilatée suivie d'une défaillance cardiaque. Toutefois, la voie de ERK n'est pas activée dans ce modèle murin. Un point intéressant à noter est que les niveaux d'expression de Ras et de Gq affectent le phénotype observé: une expression seuil est nécessaire (96,97). Cet effet seuil est peut-être atteint par l'activité constitutive du α_{1B} -AR surexprimé, entraînant ainsi une hypertrophie cardiaque.

5.3 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur

La surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage est un modèle d'étude plus physiologique : le récepteur n'étant pas muté, sa conformation tridimensionnelle ne peut pas être affectée. Ce modèle permet une signalisation grâce à une activation spontanée d'une partie des récepteurs. Toutefois, il a été suggéré que le α_{1B} -AR interagirait plus avec Gi que chez les souris normales (11), où il est couplé de façon prédominante à Gq, ce qui pourrait activer des voies moins physiologiques. Piascik et al. (98) et Akhter et al. (11) ont montré que la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage entraîne une augmentation de la quantité de DAG et d'ANF, sans changements morphologiques habituellement reliés à l'hypertrophie. Grupp et al. (28) ont montré que la surexpression de α_{1B} -AR entraîne une réduction du niveau de contractilité basal et de la performance du ventricule gauche. De plus, aucune hypertrophie n'est observée, i.e. le ratio poids du cœur/poids du corps n'est pas augmenté, les marqueurs moléculaires d'hypertrophie

cardiaque ne sont pas induits et les structures des myofibres et des sarcomères ne sont pas perturbées. Lemire et al. (30) ont montré que la surexpression du α_{1B} -AR mène à une défaillance cardiaque caractérisée par une dilatation des quatre chambres cardiaques, une augmentation du ratio poids du cœur/poids du corps, sans changement de l'épaisseur de la paroi postérieure ni du septum, une torsion ventriculaire et un désalignement des myofibres. Ils ont aussi montré qu'il y a une dilatation progressive et une perte de fonction systolique du ventricule gauche. Finalement, deux marqueurs classiques d'hypertrophie et de défaillance cardiaques sont augmentés chez ces transgéniques : l'expression de l'ANF augmente, de façon dépendante de l'âge, et l'expression de la β -MHC augmente chez les Tg avec défaillance cardiaque. Ceci suggère que le changement d'isoforme, de la α -MHC pour la β -MHC, soit en corrélation avec le développement de la défaillance cardiaque. Des changements similaires ont été liés à la défaillance du myocarde et ils ont été observés dans le cœur humain (34,99). Certaines différences ont été observées entre les modèles de surexpression du récepteur de type sauvage, sous le contrôle du promoteur de la α -MHC.

5.3.1 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et voie de ERK

Comme mentionné précédemment, la stimulation des α_{1B} -AR entraîne une activation de la voie de ERK et cette voie est impliquée dans la croissance cellulaire et l'hypertrophie. De plus, la surexpression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive mène à l'hypertrophie et à la défaillance cardiaques. Ainsi, nous avons voulu voir l'effet de la surexpression cardiaque du α_{1B} -AR de type sauvage sur la voie de ERK. Nous avons vérifié l'activation de la voie de ERK à plusieurs niveaux et ce, pour des souris Tg et nTg

de 3 et 9 mois. Comme montré dans l'article qui constitue le chapitre 4 de cet ouvrage, la voie de ERK était activée dans les cœurs Tg de 9 mois comparativement aux nTg de 3 mois, ceci étant démontré par une augmentation de la phosphorylation de MEK, ERK et p90^{RSK} (voir les résultats représentatifs dans l'Annexe 1). Toutefois, il n'y avait aucun changement significatif de l'expression de ERK ni de MEK. De plus, des essais kinase ont montré que Raf tendait aussi à être plus activé dans les cœurs Tg de 9 mois, mais l'augmentation n'était pas significative, peut-être à cause de l'amplification du signal en aval (résultats non montrés). De plus, ERK et p90^{RSK} étaient activés de façon significative chez les Tg de 3 mois, comparativement aux nTg de 3 mois. Ainsi, la surexpression du α_{1B} -AR a entraîné une activation complète de la voie de ERK mais de façon retardée, c'est-à-dire lorsque le phénotype de cardiomyopathie dilatée était bien établi, soit à 9 mois (30). Puisque la voie de ERK est impliquée dans l'hypertrophie et qu'une hypertrophie excentrique tardive est observée chez ces souris, cette même voie pourrait être impliquée dans le développement de la cardiomyopathie.

Un point intéressant à noter est que la surexpression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive entraîne une hypertrophie cardiaque, tout comme un haut niveau d'expression de Ras ou de Gq (96,97). Cependant, les voies activées en aval du récepteur actif et du récepteur de type sauvage ne sont peut-être pas les mêmes à cause d'un changement de conformation possible qui serait causé par la (les) mutation(s) activatrice(s). Ceci pourrait entraîner une différence d'affinité entre les 2 types de récepteurs et les protéines en aval, affectant ainsi la signalisation. Certaines voies pourraient aussi être inhibées suite à la surexpression du récepteur actif. De plus, il a été suggéré que la surexpression du α_{1B} -AR favoriserait sa liaison aux protéines Gi, ce qui

expliquerait peut-être que le modèle de surexpression de Gq n'entraîne pas l'activation de la voie de ERK, i.e. il y aurait peut-être des effets indépendants de Gq et dépendants de Gi. Des expériences futures pourraient aider à déterminer si Gi a des effets sur le développement de la cardiomyopathie observé chez ce modèle de souris.

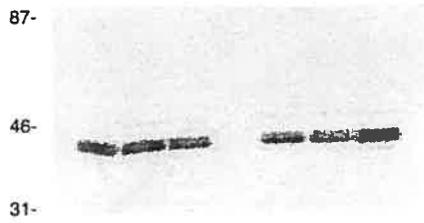
5.3.2 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et p38 MAPK

Nous avons ensuite voulu voir l'effet de la surexpression du α_{1B} -AR sur la p38 MAPK. Comme mentionné dans une section précédente, la stimulation des α_1 -AR dans les ARVM n'active pas la voie de p38 MAPK. Nous avons voulu voir si le même effet pouvait être observé *in vivo*, dans le modèle de surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur. Comme montré à la Figure 5A, l'activation de p38 MAPK tendait à être augmentée avec l'âge, autant chez les Tg que les nTg, mais la différence n'était pas significative (voir les résultats représentatifs dans l'Annexe 1). Toutefois, dans chaque catégorie de souris, un ou deux animaux montraient une activité de p38 MAPK environ 10 fois supérieure à celle observée chez la majorité des souris, expliquant ainsi les grandes barres d'erreurs. Ces animaux ont peut-être vécu un stress élevé lors du prélèvement du cœur. En ne tenant pas compte de ces valeurs extrêmes, l'activité de p38 MAPK semblait être inférieure chez les souris transgéniques par rapport aux non-transgéniques, à 9 mois (Fig. 5B). Ainsi, la régulation de l'activité de p38 MAPK semblerait être bimodale, i.e. elle semblerait être affectée par l'âge et par le transgène. Un nombre plus élevé de souris permettrait de suggérer un rôle de cette MAPK dans le développement du phénotype observé. Nous ne pouvons que suggérer que p38 MAPK ne semblait pas impliquée dans la progression du phénotype. Afin de remédier à ce

problème, il faudrait augmenter le nombre d'animaux. Comme mentionné précédemment, l'équilibre entre l'activation de la voie de ERK, JNK et p38 MAPK est important pour déterminer le destin de la cellule. Il a aussi été suggéré que l'apoptose soit impliquée dans la dilatation cardiaque. Étant donné que les cœurs transgéniques surexprimant le α_{1B} -AR deviennent dilatés avec le temps, il serait intéressant de vérifier si le niveau d'apoptose est augmenté dans les cœurs transgéniques de 9 mois comparativement aux cœurs normaux.

Annexe 1: Résultats représentatifs des immunobuvardages de type western, pour la protéine totale (A, C, E et G) et phosphorylée (B, D, F et H). Dans l'ordre, les protéines étudiées sont MEK, ERK, p90^{RSK} et p38 MAPK.

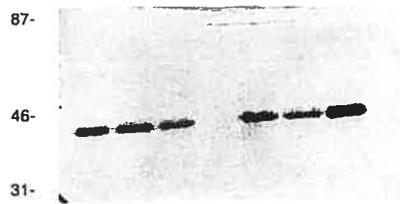
A



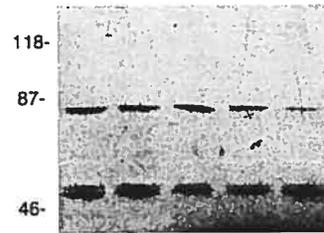
E



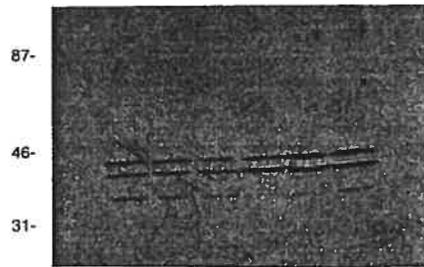
B



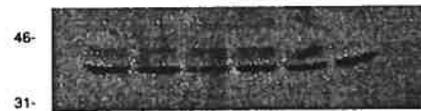
F



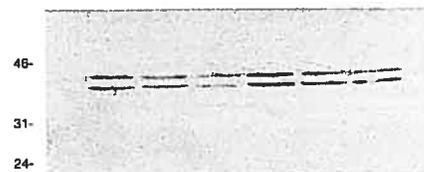
C



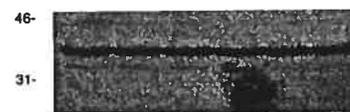
G



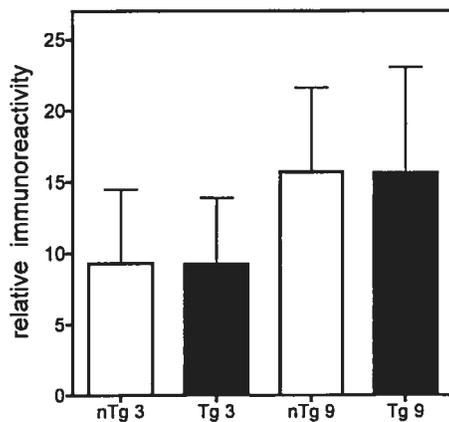
D



H



A



B

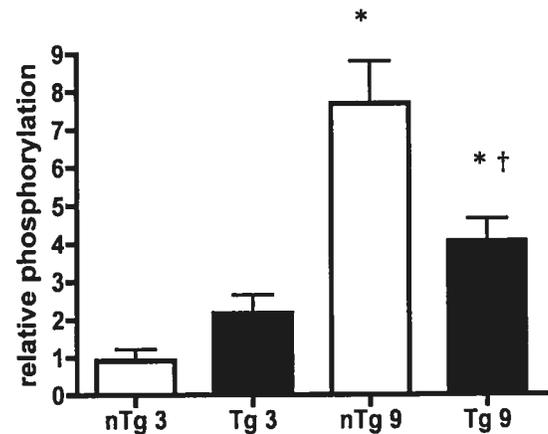


Figure 5 : Dans le cœur de souris, la phosphorylation de p38 MAPK est altérée par la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage et par l'âge. Les coeurs de souris transgéniques (Tg) et non-transgéniques (nTg) ont été homogénéisés dans du tampon de lyse et 75 μ g de lysat ont été mis sur gel SDS-PAGE 10%. Suite au transfert électrophorétique, les échantillons ont été détectés avec un anticorps anti-phospho-p38 MAPK. Les membranes ont ensuite été réutilisées pour la détection de p38 MAPK total. Les films ont été digitalisés à l'aide d'un scanner et les bandes immunoréactives ont été quantifiées à l'aide du logiciel Quantity One (Version 4.5 pour Mac OSX, BioRad Laboratories). Les résultats représentent l'immunoréactivité relative (densité des pixels \times $\text{mm}^2 \times 10^2$). Les résultats montrent la moyenne \pm écart-type de 6 coeurs transgéniques et 5-6 coeurs non-transgéniques à 3 mois (nTg 3, Tg 3) et 9 mois (nTg 9, Tg 9). Le panneau A représente les résultats de tous les animaux; pour le panneau B, les valeurs extrêmes ont été enlevées (voir explications dans le texte, section 5.3.2. * $P < 0.05$ vs nTg 3, † $P < 0.05$ vs nTg 9 (Student's *t* test).

5.3.3 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et les phosphatases

Une augmentation du niveau de phosphorylation donc d'activation de ERK peut résulter d'une augmentation de l'activité de Raf/MEK ou d'une diminution de l'activité des phosphatases. Puisque le contrôle du niveau de phosphorylation des MAPK peut décider du destin d'une cellule et que ce niveau est déterminé par les activités opposées des kinases et des phosphatases, nous avons voulu voir l'effet de la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur sur l'expression cardiaque de 3 phosphatases de MAPK : MKP1, MKP2 et MKP3. Comme mentionné dans la section 2.5.3, l'activité des phosphatases est régulée principalement au niveau de l'expression. Nous avons vérifié leur niveau d'expression en quantifiant la protéine et l'ARNm. Toutefois, tous les anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type western ont montré un haut niveau de non-spécificité et les résultats obtenus n'ont pu être utilisés pour quantifier les protéines. Nous avons donc mesuré la quantité d'ARNm des 3 MKP (voir des résultats représentatifs dans l'Annexe 2). Elles ont une double-spécificité, c'est-à-dire qu'elles déphosphorylent les résidus Tyr/Thr. De plus, MKP1 et MKP2 sont nucléaires et possèdent un site d'ancrage pour ERK. MKP1 et MKP2 peuvent être phosphorylées par ERK et, lorsque phosphorylées, elles sont moins sensibles à la dégradation (39). MKP3 est cytosolique et sa liaison à ERK augmente grandement son activité phosphatase (38,39,57,69,78-80). De plus, ERK peut induire sa synthèse créant ainsi une boucle de rétro-inhibition (69). Ces caractéristiques rendent les MKP1-3 intéressantes pour l'étude de la voie de ERK.

Comme mentionné dans l'article qui constitue le chapitre 4 de cet ouvrage, nous avons observé que l'expression de MKP1 semblait être dépendante de l'âge puisque, à 9

mois, elle était diminuée et que le transgène n'affectait pas l'expression de façon significative. Comme MKP1 est plus actif envers p38 MAPK que JNK ou ERK, l'expression de MKP1 et le niveau d'activation de p38 MAPK devraient être inversement proportionnels. En effet, à 9 mois, le niveau de phosphorylation de p38 MAPK était augmenté tandis que l'expression de MKP1 était diminuée. Ceci pourrait indiquer que la diminution de l'expression de MKP1 permettrait une signalisation plus grande via la p38 MAPK.

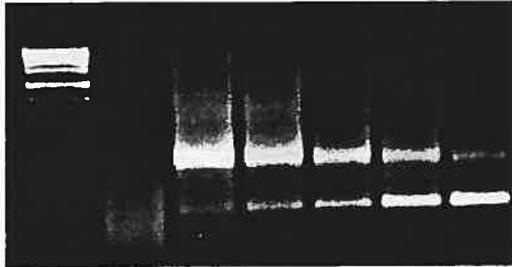
Pour ce qui est de MKP2, son patron d'expression semblait être affecté par l'âge et par le transgène. À 9 mois, l'expression de MKP2 était diminuée chez les nTg comparativement aux nTg de 3 mois. De plus, à 3 mois, le transgène a entraîné une diminution de l'expression, comparativement aux nTg. Toutefois, à 9 mois, le transgène a entraîné une augmentation non significative de l'expression. Comme mentionné précédemment, MKP2 a une activité phosphatase plus forte pour ERK et JNK, comparativement à celle pour p38 MAPK. L'expression à 3 mois et non à 9 mois était inversement proportionnelle à l'activation de ERK. La diminution de l'expression de MKP2 chez les transgéniques de 3 mois pourrait peut-être expliquer l'augmentation de l'activité de ERK chez ces souris.

Finalement, l'expression de MKP3 semblait aussi être affectée par l'âge puisque, à 9 mois, elle diminuait autant chez les Tg que les nTg, et que son expression ne changeait pas chez les Tg de 3 mois, comparativement aux nTg de 3 mois. MKP3 a une plus forte activité phosphatase pour ERK comparativement à celle pour JNK et p38 MAPK. Son expression n'était pas inversement proportionnelle à l'activation de ERK,

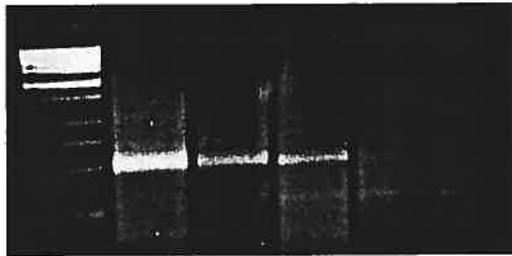
sauf chez les Tg de 9 mois. L'expression de MKP3 était diminuée chez les Tg de 9 mois, suggérant un rôle possible dans l'augmentation de l'activité de ERK.

Annexe 2: Résultats représentatifs des expériences de RT-PCR compétitive. A: MKP1, B: MKP2, C:MKP3.

A



B



C



Les MKP1-3 ne sont pas les seules phosphatases à agir sur les MAPK. Toutefois, nous avons peut-être identifié 2 composantes de la signalisation de ERK impliquées dans les divers stades du développement de la cardiomyopathie. Ainsi, la diminution de l'expression de la MKP2 semble permettre une augmentation de l'activité de ERK chez les Tg de 3 mois tandis que chez les Tg de 9 mois, la diminution de l'expression de MKP3 semble permettre une augmentation de l'activité de ERK.

La spécificité des MKP dépendrait de leur présence pendant un événement cellulaire particulier. Certaines phosphatases à Tyr et/ou à Ser/Thr peuvent affecter le niveau de phosphorylation des MAPK et d'autres protéines, régulant ainsi la signalisation cellulaire à d'autres niveaux. Toutefois, il est possible que plusieurs signaux parviennent à la voie de ERK et que ces derniers varient avec l'âge et le transgène. Il serait intéressant de vérifier si le niveau d'expression des MKP1-3 varie de la même façon dans les cœurs humains défaillants (disponibles dans notre laboratoire) que chez ce modèle de souris transgénique.

5.3.4 Surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur et MCIP1

Comme mentionné précédemment, la stimulation de certains RCPG active la PLC, ce qui entraîne une augmentation de la quantité d'IP₃ donc de la concentration de calcium intracellulaire. Ce calcium est essentiel à l'activité de la calcineurine : la calmoduline lie le calcium et ensuite, le complexe lie et active la calcineurine (Figure 6). La calcineurine (ou PP2B) est une phosphatase à Ser/Thr impliquée dans l'hypertrophie cardiaque (20,60,62). Elle peut induire la transcription de certains

gènes et l'activation de protéines kinases. Comme mentionné précédemment, l'activation de la calcineurine est associée à l'activation de plusieurs kinases dont ERK. À forte concentration, MCIP1 inhibe la calcineurine en se liant à la sous-unité catalytique de la phosphatase (64,65). Il a été montré que le niveau d'expression de MCIP1 donne une indication de l'état d'activation de la calcineurine.

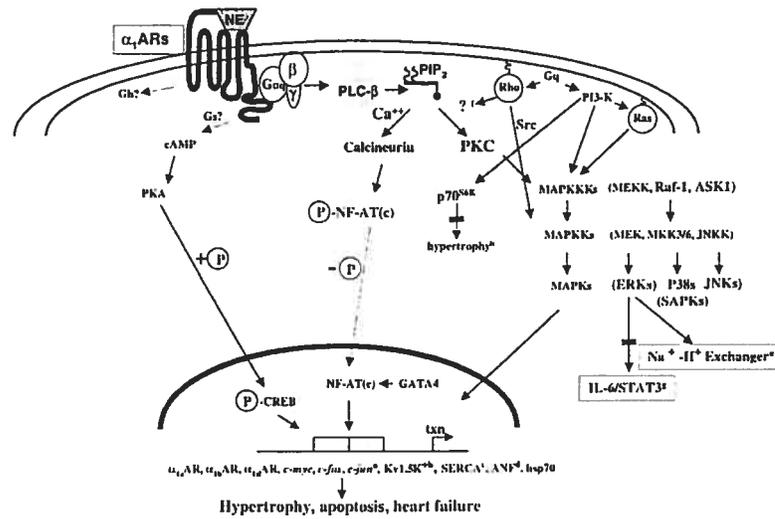


Figure 6: Signalisation menant à l'hypertrophie cardiaque. (Figure tirée de Michelotti et al. (9))

Puisque la surexpression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive mène à l'hypertrophie, que la calcineurine est liée à l'hypertrophie, que Gq induit la calcineurine et que α_{1B} -AR est couplé de façon prédominante à Gq, nous avons voulu vérifier l'effet de la surexpression du α_{1B} -AR sur la calcineurine. Nous avons mesuré l'activité de la calcineurine via l'expression de MCIP1. La quantité de MCIP1 était augmentée chez les transgéniques. Ainsi, nous pouvons supposer que la calcineurine était fortement activée chez les Tg.

CHAPITRE 6. CONCLUSION

6 Conclusion

La surexpression du α_{1B} -AR actif de façon constitutive ou des composantes en aval du récepteur, comme Gq ou Ras, mène à une réponse hypertrophique et à une défaillance cardiaque. Les raisons de l'établissement tardif du phénotype de défaillance cardiaque chez les souris surexprimant le α_{1B} -AR ne sont pas claires. Le vieillissement normal causerait peut-être suffisamment de stress pour entraîner la décompensation. En effet, le cœur vieillissant subit des changements fonctionnels et moléculaires similaires quoique moins sévères à ceux retrouvés dans le cœur défaillant. Dans la présente étude, plusieurs changements dépendants de l'âge ont été observés (Tableau 2) : augmentation de la phosphorylation de ERK chez les Tg, de p90^{RSK} chez les Tg et nTg, de p38 MAPK chez les nTg, de l'expression de MCIP1 chez les Tg et une diminution de MKP1-3 chez les nTg et de MKP1 chez les Tg. La surexpression du α_{1B} -AR a mené à une augmentation de l'activité de la voie de ERK à âge avancé, soit 9 mois. Aucune hypertrophie n'a été observée aux âges étudiés, malgré l'augmentation de l'expression de l'ANF et de la β -MHC, et l'augmentation de l'activité de la calcineurine. Les voies de signalisation impliquées dans ce modèle étaient peut-être différentes de celles impliquées dans le modèle de surexpression du récepteur activé ou de Ras ou de la protéine Gq. Comme mentionné précédemment, le récepteur de type sauvage pourrait se coupler d'avantage à la protéine Gi, ce qui inhiberait l'AC donc entraînerait une diminution de l'activité de la PKA. De plus, une expression seuil est nécessaire pour le développement de l'hypertrophie suivie de la défaillance cardiaque, comme observé par l'expression du récepteur α_{1B} -AR actif de façon constitutive ou de la protéine

Gq. Un mécanisme compensatoire est peut-être nécessaire lors du développement afin d'empêcher la cardiomyopathie. Les cœurs défaillants surexprimant le α_{1B} -AR de type sauvage sont toutefois hypertrophiés : il serait intéressant de vérifier le niveau d'activation des voies de MAPK, d'activité de la calcineurine et d'expression des MKP afin de voir si elles changent après le développement de ce stade tardif de la défaillance cardiaque.

La régulation de la signalisation directement au niveau de l'activité du récepteur serait peut-être un point de contrôle de la signalisation en aval donc de l'établissement tardif de l'hypertrophie excentrique, de la dilatation et de la défaillance cardiaque. De plus, puisque la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage entraîne une hypertrophie cardiaque tardive, il est possible que des mécanismes compensatoires soient activés pour prévenir et/ou retarder l'établissement de l'hypertrophie et, éventuellement, de la défaillance cardiaque. Des expériences dans lesquelles les souris ont été injectées quotidiennement avec 5mg/kg de prazosin, pendant une semaine, sont en cours afin de voir si les effets de la surexpression du α_{1B} -AR peuvent être renversés. Le prazosin est un antagoniste des α_1 -AR. De plus, il serait intéressant de vérifier si les kinases et les phosphatases ont la même activité dans les cœurs défaillants où une hypertrophie décompensée est observée.

Cette étude a permis de montrer que la voie de ERK pourrait être impliquée dans le développement de la dilatation observée lors de la surexpression du α_{1B} -AR de type sauvage dans le cœur. De plus, la calcineurine serait activée dans les cœurs transgéniques et l'augmentation de la quantité de MCIP1 dans le cœur serait peut-être suffisante pour empêcher l'hypertrophie. L'absence d'hypertrophie dans ces

cœurs suggère que l'activation de la calcineurine ne soit pas suffisante pour causer l'hypertrophie et que d'autres mécanismes soient nécessaires. Chez l'Homme, les inhibiteurs de la calcineurine ont des effets secondaires néfastes sur le rein (100) donc l'inhibition d'autres protéines impliquées dans l'hypertrophie pourrait être bénéfique. De plus, l'expression de l'ANF et de la β -MHC est augmentée chez les Tg, malgré l'absence d'hypertrophie. Ceci suggère que certaines protéines peuvent être liées à l'hypertrophie mais que leur expression n'est pas exclusive à cet état. La forte incidence des pathologies cardiaques et leur étiologie grandement inconnue, surtout au niveau des mécanismes moléculaires font d'elles des ennemis sans pitié du 21^e siècle. Ces animaux transgéniques surexprimant le α_{1B} -AR constituent un modèle d'étude intéressant pour l'étude de la contribution de ce récepteur dans le développement de ces pathologies.

RÉFÉRENCES

1. Hermans, E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors *Pharmacol Ther* **99**, 25-44
2. Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success *Embo J* **18**, 1723-1729
3. Bunemann, M., Frank, M., and Lohse, M. J. (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16077-16082
4. Rebois, R. V., Warner, D. R., and Basi, N. S. (1997) Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cell Signal* **9**, 141-151
5. Garcia-Sainz, J. A., Vazquez-Prado, J., and Villalobos-Molina, R. (1999) alpha1-adrenoreceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* **30**, 449-458
6. Xiang, Y., and Kobilka, B. K. (2003) Myocyte adrenoceptor signaling pathways *Science* **300**, 1530-1532
7. Varma, D. R., and Deng, X. F. (2000) Cardiovascular alpha1-adrenoceptor subtypes: functions and signaling *Can J Physiol Pharmacol* **78**, 267-292
8. Hu, Z. W., Shi, X. Y., Lin, R. Z., and Hoffman, B. B. (1999) Contrasting signaling pathways of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor subtype

activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH3T3 cells *Mol Endocrinol* **13**, 3-14

9. Michelotti, G. A., Price, D. T., and Schwinn, D. A. (2000) Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications *Pharmacol Ther* **88**, 281-309
10. Brodde, O. E., and Michel, M. C. (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart *Pharmacol Rev* **51**, 651-690
11. Akhter, S. A., Milano, C. A., Shotwell, K. F., Cho, M. C., Rockman, H. A., Lefkowitz, R. J., and Koch, W. J. (1997) Transgenic mice with cardiac overexpression of alpha1B-adrenergic receptors. In vivo alpha1-adrenergic receptor-mediated regulation of beta-adrenergic signaling *J. Biol. Chem.* **272**, 21253-21259
12. Koshimizu, T. A., Tanoue, A., Hirasawa, A., Yamauchi, J., and Tsujimoto, G. (2003) Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology *Pharmacol Ther* **98**, 235-244
13. Takeishi, Y., Huang, Q., Abe, J., Glassman, M., Che, W., Lee, J. D., Kawakatsu, H., Lawrence, E. G., Hoit, B. D., Berk, B. C., and Walsh, R. A. (2001) Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1637-1648
14. Wilkins, B. J., and Molkenin, J. D. (2002) Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *J Physiol* **541**, 1-8

15. De Windt, L. J., Lim, H. W., Haq, S., Force, T., and Molkenin, J. D. (2000) Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH₂-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways *J. Biol. Chem.* **275**, 13571-13579
16. Lee, K. H., Lee, N., Lim, S., Jung, H., Ko, Y. G., Park, H. Y., Jang, Y., Lee, H., and Hwang, K. C. (2003) Calreticulin inhibits the MEK1,2-ERK1,2 pathway in alpha 1-adrenergic receptor/Gh-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**, 101-107
17. LaMorte, V. J., Thorburn, J., Absher, D., Spiegel, A., Brown, J. H., Chien, K. R., Feramisco, J. R., and Knowlton, K. U. (1994) Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation *J Biol Chem* **269**, 13490-13496
18. Xiao, L., Pimental, D. R., Amin, J. K., Singh, K., Sawyer, D. B., and Colucci, W. S. (2001) MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes *J Mol Cell Cardiol* **33**, 779-787
19. Haq, S., Choukroun, G., Lim, H. W., Tymitz, K. M., del Monte, F., Gwathmey, J., Grazette, L., Michael, A., Hajjar, R. J., Force, T., and Molkenin, J. D. (2001) Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* **103**, 670-677
20. Vega, R. B., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2003) Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling *J Biol Chem* **278**, 36981-36984

21. Frey, N., McKinsey, T. A., and Olson, E. N. (2000) Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function *Nat Med* **6**, 1221-1227
22. Subramaniam, A., Jones, W. K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., and Robbins, J. (1991) Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice *J Biol Chem* **266**, 24613-24620
23. Milano, C. A., Dolber, P. C., Rockman, H. A., Bond, R. A., Venable, M. E., Allen, L. F., and Lefkowitz, R. J. (1994) Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10109-10113
24. Zuscik, M. J., Chalothorn, D., Hellard, D., Deighan, C., McGee, A., Daly, C. J., Waugh, D. J., Ross, S. A., Gaivin, R. J., Morehead, A. J., Thomas, J. D., Plow, E. F., McGrath, J. C., Piascik, M. T., and Perez, D. M. (2001) Hypotension, autonomic failure, and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing the α_{1B} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 13738-13743
25. Chalothorn, D., McCune, D. F., Edelmann, S. E., Tobita, K., Keller, B. B., Lasley, R. D., Perez, D. M., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Post, G. R., and Piascik, M. T. (2003) Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha 1B- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 1045-1053
26. McWhinney, C., Wenham, D., Kanwal, S., Kalman, V., Hansen, C., and Robishaw, J. D. (2000) Constitutively active mutants of the alpha(1a)- and the alpha(1b)-adrenergic receptor subtypes reveal coupling to different signaling pathways and physiological responses in rat cardiac myocytes *J Biol Chem* **275**, 2087-2097

27. Selvetella, G., Hirsch, E., Notte, A., Tarone, G., and Lembo, G. (2004) Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence *Cardiovasc Res* **63**, 373-380
28. Grupp, I. L., Lorenz, J. N., Walsh, R. A., Boivin, G. P., and Rindt, H. (1998) Overexpression of α_{1B} -adrenergic receptor induces left ventricular dysfunction in the absence of hypertrophy *Am. J. Physiol.* **275**, H1338-H1350
29. Lemire, I., Allen, B. G., Rindt, H., and Hébert, T. E. (1998) Cardiac-specific overexpression of α_{1B} AR regulates β AR activity via molecular crosstalk *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 1827-1839
30. Lemire, I., Ducharme, A., Poulin, F., Tardif, J.-C., Jones, L. R., Allen, B. G., Hébert, T. E., and Rindt, H. (2001) Cardiac-directed overexpression of wild type α_{1B} -AR induces dilated cardiomyopathy *Am. J. Physiol.* **281**, H931-H938
31. Collins JF, P.-D. C., Davis MG, Ball N, Dorn GW 2nd, Walsh RA. (1996) The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1435-1443
32. Camps, M., Nichols, A., and Arkininstall, S. (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function *Faseb J* **14**, 6-16
33. Toews, M. L., Prinster, S. C., and Schulte, N. A. (2003) Regulation of alpha-1B adrenergic receptor localization, trafficking, function, and stability *Life Sci* **74**, 379-389

34. Bogoyevitch, M. A., Andersson, M. B., Gillespie-Brown, J., Clerk, A., Glennon, P. E., Fuller, S. J., and Sugden, P. H. (1996) Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy *Biochem J* **314** (Pt 1), 115-121
35. Bueno, O. F., and Molkenin, J. D. (2002) Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res.* **91**, 776-781
36. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human *Physiol Rev* **79**, 143-180
37. Franklin, C. C., and Kraft, A. S. (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells *J Biol Chem* **272**, 16917-16923
38. Keyse, S. M. (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling *Curr Opin Cell Biol* **12**, 186-192
39. Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2003) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling *Eur J Biochem* **270**, 3291-3299
40. Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions *Biochem J* **351** Pt 2, 289-305
41. Saxena, M., and Mustelin, T. (2000) Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase *Semin. Immunol.* **12**, 387-396

42. Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1999) Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches *Sci STKE* **1999**, PE1
43. Hsiao, K. M., Chou, S. Y., Shih, S. J., and Ferrell, J. E., Jr. (1994) Evidence that inactive p42 mitogen-activated protein kinase and inactive Rsk exist as a heterodimer in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5480-5484
44. Frodin, M., and Gammeltoft, S. (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction *Mol Cell Endocrinol* **151**, 65-77
45. Zhang, Y., Zhong, S., Dong, Z., Chen, N., Bode, A. M., and Ma, W. (2001) UVA induces Ser381 phosphorylation of p90^{RSK}/MAPKAP-K1 via ERK and JNK pathways *J Biol Chem* **276**, 14572-14580
46. Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., and Kolch, W. (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein *Mol Cell Biol* **20**, 3079-3085
47. Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals *Trends Biochem Sci* **23**, 481-485
48. Kim, D. W., and Cochran, B. H. (2000) Extracellular signal-regulated kinase binds to TFII-I and regulates its activation of the c-fos promoter *Mol Cell Biol* **20**, 1140-1148

49. Fukuda, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase *Embo J* **16**, 1901-1908
50. Mitsushima, M., Suwa, A., Amachi, T., Ueda, K., and Kioka, N. (2004) Extracellular signal-regulated kinase activated by epidermal growth factor and cell adhesion interacts with and phosphorylates vimentin *J Biol Chem* **279**, 34570-34577
51. Chen, P., Hutter, D., Yang, X., Gorospe, M., Davis, R. J., and Liu, Y. (2001) Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically *J Biol Chem* **276**, 29440-29449
52. Zhou, B., Wu, L., Shen, K., Zhang, J., Lawrence, D. S., and Zhang, Z. Y. (2001) Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2 *J Biol Chem* **276**, 6506-6515
53. Seternes, O. M., Johansen, B., Hegge, B., Johannessen, M., Keyse, S. M., and Moens, U. (2002) Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress *Mol Cell Biol* **22**, 6931-6945
54. Lin, A. (2003) Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis *Bioessays* **25**, 17-24
55. Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S. M., Mortensen, O. H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N. K., and Moller, N. P. (2004) A genomic

perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage *Faseb J* **18**, 8-30

56. Takano, H., Zou, Y., Akazawa, H., Toko, H., Mizukami, M., Hasegawa, H., Asakawa, M., Nagai, T., and Komuro, I. (2002) Inhibitory molecules in signal transduction pathways of cardiac hypertrophy *Hypertens Res* **25**, 491-498
57. Haneda, M., Sugimoto, T., and Kikkawa, R. (1999) Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade *Eur. J. Pharmacol.* **365**, 1-7
58. Carr, A. N., Schmidt, A. G., Suzuki, Y., del Monte, F., Sato, Y., Lanner, C., Breeden, K., Jing, S.-L., Allen, P.-B., Greengard, P., Yatani, A., Hoit, B. D., Grupp, I. L., Hajjar, R. J., DePaoli-Roach, A. A., and Kranias, E. G. (2002) Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function *Mol Cell Biol* **22**, 4124-4135
59. Stull, J. T. (2001) Ca²⁺-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series *J Biol Chem* **276**, 2311-2312
60. Rothermel, B. A., McKinsey, T. A., Vega, R. B., Nicol, R. L., Mammem, P., Yang, J., Antos, C. L., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., and Williams, R. S. (2001) Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3328-3333
61. Communal, C., Colucci, W. S., Remondino, A., Sawyer, D. B., Port, J. D., Wichman, S. E., Bristow, M. R., and Singh, K. (2002) Reciprocal

modulation of mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and 2 in failing human myocardium *J Cardiac Failure* **8**, 86-92

62. Lim, H. W., New, L., Han, J., and Molkenin, J. D. (2001) Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes *J. Biol. Chem.* **276**, 15913-15919
63. Vega, R. B., Yang, J., Rothermel, B. A., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2002) Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity *J Biol Chem* **277**, 30401-30407
64. Yang, J., Rothermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles *Circ. Res.*
65. Rothermel, B. A., Vega, R. B., and Williams, R. S. (2003) The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling *Trends Cardiovasc Med* **13**, 15-21
66. Vega, R. B., Rothermel, B. A., Weinheimer, C. J., Kovacs, A., Naseem, R. H., Bassel-Duby, R., Williams, R. S., and Olson, E. N. (2003) Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 669-674
67. Wang, Y., De Keulenaer, G. W., Weinberg, E. O., Muangman, S., Gualberto, A., Landschulz, K. T., Turi, T. G., Thompson, J. F., and Lee, R. T. (2002) Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down

Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H533-H539

68. Rothermel, B., Vega, R. B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2000) A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling *J Biol Chem* **275**, 8719-8725
69. Reffas, S., and Schlegel, W. (2000) Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells. *Biochem. J.* **352**, 701-807
70. Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J., and McKenzie, F. R. (1997) The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade *J. Biol. Chem.* **272**, 1368-1376
71. Cook, S. J., Beltman, J., Cadwallader, K. A., McMahon, M., and McCormick, F. (1997) Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent signal pathways in Rat-1 cells *J Biol Chem* **272**, 13309-13319
72. Clark, A. R. (2003) MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J Endocrinol* **178**, 5-12
73. Bokemeyer, D., Lindemann, M., and Kramer, H. J. (1998) Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells *Hypertension* **32**, 661-667

74. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., Takano, H., Hiroi, Y., Ueki, K., and Tobe, K. (1995) Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes *J Clin Invest* **96**, 438-446
75. Fuller, S. J., Davies, E. L., Gillespie-Brown, J., Sun, H., and Tonks, N. K. (1997) Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 inhibits the stimulation of gene expression by hypertrophic agonists in cardiac myocytes *Biochem J* **323**, 313-319
76. Bueno, O. F., De Windt, L. J., Lim, H. W., Tymitz, K. M., Witt, S. A., Kimball, T. R., and Molkentin, J. D. (2001) The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo *Circ Res* **88**, 88-96
77. Hayashi, D., Kudoh, S., Shiojima, I., Zou, Y., Harada, K., Shimoyama, M., Imai, Y., Monzen, K., Yamazaki, T., Yazaki, Y., Nagai, R., and Komuro, I. (2004) Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocytes hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 *biochem Biophys Res Comm* **322**, 310-319
78. Rigas, J. D., Hoff, R. H., Rice, A. E., Hengge, A. C., and Denu, J. M. (2001) Transition state analysis and requirement of Asp-262 general acid/base catalyst for full activation of dual-specificity phosphatase MKP3 by extracellular regulated kinase *Biochemistry* **40**, 4398-4406
79. Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., and Arkinstall, S. (1998) Catalytic activation of the

phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase *Science* **280**, 1262-1265

80. Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Davies, K., Ashworth, A., and Arkinstall, S. (1998) The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity *J Biol Chem* **273**, 9323-9329
81. Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., and Anversa, P. (1991) Cardiomyopathy of the aging human heart: myocyte loss and reactive cellular hypertrophy *Circ Res* **68**, 1560-1568
82. Ziegler, M. G., Lake, C. R., and Kopin, I. J. (1976) Plasma noradrenaline increases with age *Nature (Lond)* **261**, 333-335
83. Brodde, O. E., and Leineweber, K. (2004) Autonomic receptor systems in the failing and aging human heart: similarities and differences *Eur J Pharmacol* **500**, 167-176
84. Roka, F., Freissmuth, M., and Nanoff, C. (2000) G protein-dependent signalling and ageing. *Exp Gerontol* **35**, 133-143
85. Roth, D. A., White, C. D., Podolin, D. A., and Mazzeo, R. S. (1998) Alterations in myocardial signal transduction due to aging and chronic dynamic exercise *J Appl Physiol* **84**, 177-184
86. Feldman, A. M., Cates, A. E., Veazey, W. B., Hershberger, R. E., Bristow, M. R., Baughman, K. L., Baumgartner, W. A., and Van Dop, C. (1988)

Increase in the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart *J Clin Invest* **82**, 189-197

87. Bristow, M. R., and Feldman, A. M. (1992) Changes in the receptor-G-protein-adenylyl cyclase system in heart failure from various types of heart muscle disease *Basic Res Cardiol* **87**, 15-35
88. Bohm, M. (1995) Alterations of beta-adrenoceptors-G-protein-regulated adenylyl-cyclase in heart failure *Mol Cell Biochem* **147**, 147-160
89. Brodde, O. E., Michel, M. C., and Zerkowski, H. R. (1995) Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure *Cardiovasc Res* **30**, 570-584
90. Kilts, J. D., Akawaza, T., Richardson, M. D., and Kwatra, M. M. (2002) Age increases cardiac Galphai2 expression, resulting in enhanced coupling to G protein-coupled receptors *J Biol Chem* **277**, 31257-31262
91. Kimball, T. R., Comett, L. E., Seifen, E., and Kennedy, R. H. (1991) Aging: changes in cardiac alpha1-adrenoreceptor responsiveness and expression *Eur J Pharmacol* **208**, 231-238
92. Gascon, S., Dierssen, M., Marmol, F., Vivas, N. M., and Badia, A. (1993) Effects of age on alpha1-adrenoreceptor subtypes in the heart ventricular muscle of the rat *J Pharm Pharmacol* **45**, 907-909
93. Miller, J. W., Hu, Z. W., Okazaki, M., Fujinaga, M., and Hoffman, B. B. (1996) Expression of alpha1 adrenergic receptor subtype mRNAs in the rat cardiovascular system with aging *Mechanisms of Ageing and Development* **87**, 75-89

94. Hunter, J. J., Tanaka, N., Rockman, H. A., Ross, J., Jr., and Chien, K. R. (1995) Ventricular expression of a MLC-2 ν -ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice *J. Biol. Chem.* **270**, 23173-23178
95. D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B., and Dorn, G. W., 2nd. (1997) Transgenic G α q overexpression induces cardiac contractile failure in mice *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8121-8126
96. Sakata, Y., Hoit, B. D., Liggett, S. B., Walsh, R. A., and Dorn, G. W., II. (1998) Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G α q-overexpressing mice *Circulation* **97**, 1488-1495
97. Mende, U., Kagen, A., Aramburu, J., Schoen, F. J., and Neer, E. J. (1998) Transient cardiac expression of constitutively active G α q leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**,
98. Piascik, M. T., and Perez, D. M. (2001) Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions *J Pharmacol Exp Ther* **298**, 403-410
99. Nakao, K., Minobe, W., Roden, R., Bristow, M. R., and Leinwand, L. A. (1997) Myosin heavy chain gene expression in human heart failure *J Clin Invest* **100**, 2362-2370
100. Mihatsch, M. J., Kyo, M., Morozumi, K., Yamaguchi, Y., Nickeleit, V., and Ryffel, B. (1998) The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus *Clin Nephrol* **49**, 356-363