

2m11.2629.6

Université de Montréal

**Régulation du facteur répresseur de la traduction 4E-BP1 par l'angiotensine II
dans les cellules de muscles lisses vasculaires.**

Par

Manon Fleurent

Département de Pharmacologie

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 pharmacologie

Juillet 1998

© Manon Fleurent, 1998



W

4

U58

1998

v.016

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Régulation du facteur répresseur de la traduction 4E-BP1 par l'angiotensine II
dans les cellules de muscles lisses vasculaires.**

Présenté par:

Manon Fleurent

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

<u>Richard Montparler</u>	:	président-rapporteur
<u>Sylvain Meloche</u>	:	directeur de recherche
<u>Trang Hoang</u>	:	membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Bien que les fonctions physiologiques classiques de l'angiotensine II (AII) au niveau du système cardiovasculaire ont été caractérisées dans le passé (homéostasie eau-électrolyte, effet inotrope positif sur le coeur, etc...), il est maintenant bien établi que cette hormone agit également en tant que facteur de croissance pour certain type de cellules du système cardiovasculaire. Ainsi, l'AII induit la synthèse de protéines (effet hypertrophique) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les cardiomyocytes sans induire la synthèse d'ADN (effet hyperplasique). Puisque certaines pathologies du système cardiovasculaire sont caractérisées entre autre par l'hypertrophie des CMLV (telles que l'hypertension, la resténose etc...), il est important, voir même essentiel de comprendre et d'étudier les bases fondamentales de la synthèse de protéines induite par l'AII. La synthèse de protéines est d'ailleurs un des principaux processus métaboliques de la cellule démontrant une régulation complexe impliquant de nombreux facteurs protéiques. La protéine 4E-BP1 se lie au facteur limitant de l'initiation de la traduction, eIF4E, ce qui a pour effet d'inhiber l'initiation de la traduction. La phosphorylation de 4E-BP1 module négativement cette liaison permettant ainsi la libération d'eIF4E qui peut alors se lier au facteur eIF4G pour former un complexe eIF4F fonctionnel et nécessaire pour débiter l'initiation de la traduction. Le but de nos travaux était tout d'abord de vérifier l'effet de l'AII sur la phosphorylation de 4E-BP1 et ensuite de définir les voies de signalisation qui modulent cette phosphorylation.

Nous avons démontré que l'AII, par la stimulation du sous-type de récepteur AT₁, induit la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 d'une façon dépendante du temps et de la dose avec un effet maximum atteint à 15 min en présence de 100 nM d'AII. Nous avons également déterminé que suite à la stimulation par l'AII, 4E-BP1 est phosphorylée sur au moins huit sites contenant des résidus sérine/thréonine. Cette phosphorylation induite par AII diminue l'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E ce qui occasionne la dissociation du complexe 4E-BP1/eIF4E.

Contrairement à ce qui avait été avancé antérieurement, la phosphorylation de 4E-BP1 semble se produire selon un mécanisme indépendant des MAP kinases de la famille des ERK. Tout d'abord, les cinétiques d'activation de 4E-BP1 et de ERK1/2 sont différentes et le PD 98059, un inhibiteur pharmacologique des MAP kinase kinases MEK1/2 (donc de l'activation des ERKs), ne bloque pas la phosphorylation de 4E-BP1. De plus, ERK1 phosphoryle 4E-BP1 sur un seul site *in vitro* contrairement aux huit sites observés dans nos études *in vivo*.

Dans le but d'identifier les voies de signalisations responsables de la phosphorylation de 4E-BP1, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques de différentes voies de signalisation. Nous avons observé une inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1 induite par l'AII suite au traitement des cellules avec les composés intervenant au niveau des voies de la p70^{S6K} (rapamycine), de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (LY294002), de la protéine kinase C (PKC) (GF109203X et Gö6976) ainsi qu'avec le chélateur de calcium BAPTA-AM. La diminution de l'affinité de 4E-BP1 envers eIF4E induite par l'AII est également renversée suite aux traitements par ces composés.

Selon les résultats obtenus par les analyses préliminaires de cartes phosphopeptidiques réalisées suite au traitement des cellules avec les composés rapamycine, LY294002 et Gö6976, plusieurs voies semblent impliquées dans la phosphorylation de 4E-BP1 et ce, en fonction de différents degrés puisque les sites de phosphorylation ne sont pas tous affectés de la même façon. Une phosphorylation de base semble également observable.

De plus en plus d'évidences attribuent un rôle direct à l'AII dans la régulation de la synthèse de protéines. Les résultats obtenus lors de ces travaux peuvent en effet définir un nouveau mécanisme par lequel l'AII exercerait ses effets trophiques sur les cellules musculaires lisses vasculaires. L'hormone agirait ainsi directement sur la régulation de la machinerie traductionnelle, menant ainsi à une augmentation du taux global de la synthèse de protéines.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

A. Angiotensine II:

I. Caractéristiques.....	2
II. Rôles majeurs de l'angiotensine II	2
1. Actions biologiques et physiologiques de l'angiotensine II	2
2. Effets de l'angiotensine II sur la croissance cellulaire.....	3
3. Pathologies.....	4
III. Récepteurs de l'angiotensine II.....	4
1. Caractéristiques des récepteurs AT ₁ et AT ₂	4
IV. Mécanismes de signalisation.....	7
1. Famille de récepteurs	7
2. Voie des phosphoinositides.....	9
3. L'AMPC cyclique.....	13
4. Les MAP kinases.....	14
4.1. Généralités sur les MAP kinases	14
4.2. Activation et inactivation de la cascade des MAP kinases	14
4.3. Rôle des MAP kinases.....	17
4.4. Relations croisées entre la voie des ERKs et autres voies de signalisation	20
5. Autres protéines kinases	20
5.1. PI3K.....	20
5.2. p70 ^{S6K} et p90 ^{RSK}	21
6. Phosphorylation en tyrosine	23

B. Synthèse de protéines:

I. Généralités et importance dans la cellule	24
II. Étapes et mécanismes de la traduction.....	25
1. Initiation de la traduction	26
2. Elongation de la traduction	32
3. Terminaison de la traduction.....	33

III. Régulation de la traduction.....	35
1. Etapes limitantes de la traduction.....	35
2. Facteurs d'initiation de la traduction impliqués dans la régulation hormonale de la traduction.....	36
2.1. eIF2.....	36
2.2. eIF4F.....	36
2.3. eIF4E.....	37
2.3.1. Caractéristiques.....	37
2.3.2. Rôle de eIF4E dans la cellule.....	38
2.3.3. Régulation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E.....	39
2.3.3.1. Phosphorylation.....	39
2.3.3.2. Protéines se liant au facteur d'initiation de la traduction 4E.....	41
2.3.3.3. Surexpression et sous-expression du facteur d'initiation eIF4E.....	42
2.4. Autres protéines impliquées dans la régulation de la traduction.....	44

C. Les protéines régulatrices 4E-BP1 et 4E-BP2

I. Caractéristiques.....	44
II. Rôles dans l'initiation de la traduction.....	47
III. La régulation de 4E-BP1.....	48

CHAPITRE 2: MANUSCRIT

Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism.

Résumé.....	55
Summary.....	56
Introduction.....	56-57
Experimental procedure.....	57-58
Materials and Antibodies.....	57
Cell culture.....	57
Immunoblot Analysis of 4E-BP1.....	57
Preparation of recombinant proteins.....	57
Association of 4E-BP1 with eIF4E <i>in vivo</i>	57
³² P labelling and immunoprecipitation.....	57
<i>In vitro</i> phosphorylation of 4E-BP1.....	57
Peptide mapping and phosphoamino acid analysis.....	58
ERK assays.....	58

Results.....	58-61
AII stimulates phosphorylation of 4E-BP1 in aortic smooth muscle cells.....	58
Phosphorylation of 4E-BP1 by AII decreases its affinity for eIF4E	59
AII stimulates phosphorylation of 4E-BP1 on multiple serine and threonine residues.....	60
Lack of involvement of ERK1/ERK2 in the phosphorylation of 4E-BP1 induced by AII	60
Discussion.....	61
Acknowledgments.....	62
References	62

CHAPITRE 3: DISCUSSION

1. Régulation de 4E-BP1	66
2. Voies de signalisation de 4E-BP1	68
3. Analyses des voies de signalisation impliquées dans la régulation de 4E-BP1 dans les CMLA.....	71
4. Conclusions et perspectives	81
REFERENCES.....	85

LISTE DES TABLEAUX**INTRODUCTION**

Tableau I: Propriétés des sous-types de récepteurs de l'angiotensine II..... 5

Tableau II: Propriétés des facteurs eucaryotiques de la traduction28-29

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1: Mécanisme de transmission du signal impliqué dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteurs AT ₁	10
Figure 2: Voie de signalisation classique des phosphoinositides stimulée par l'angiotensine II par le récepteur AT ₁	11
Figure 3: Stimulation de la voie des MAP kinases par les facteurs de croissance et par l'angiotensine II dans les cellules de muscles lisses vasculaires..	16
Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.....	27
Figure 5: Représentation schématique du cycle d'élongation de la synthèse de protéines chez les eucaryotes	34
Figure 6: Séquence d'acides aminés et alignements prédit entre A) 4E-BP1 et 4E-BP2 et B) 4E-BP1 et PHAS-I	45
Figure 7: Représentation schématique des voies de signalisation impliquant la protéine mTOR/FRAP et menant au contrôle de la traduction suite à la stimulation par des facteurs de croissance	51

MANUSCRIT

Figure 1: AII stimulates phosphorylation of 4E-BP1 in aortic SMC.....	57
Figure 2: Effect of AII receptor antagonists on AII stimulation of 4E-BP1 Phosphorylation.....	58
Figure 3: Stimulation of 4E-BP1 phosphorylation by AII in rat fibroblasts expressing the human AT ₁ receptor	58
Figure 4: AII stimulation of 4E-BP1 phosphorylation promotes its dissociation from eIF4E in aortic SMC	58
Figure 5: 4E-BP1 is phosphorylated on serine and threonine residues.....	58

Figure 6: Phosphopeptide mapping of 4E-BP1 in quiescent and AII-stimulated aortic SMC.....	59
Figure 7: Time course of AII-stimulated ERK1 activation in aortic SMC	60
Figure 8: Phosphorylation of 4E-BP1 by ERK1	60
Figure 9: Effect of the MEK inhibitor PD 98059 on AII-stimulated phosphorylation of 4E-BP1 in aortic SMC	61

DISCUSSION

Figure 1: Voies de signalisation de la p70 ^{S6K}	70
Figure 2: Effets d'inhibiteurs pharmacologiques agissant au niveau des voies de signalisation de la PKC, du Ca ²⁺ , de la p70 ^{S6K} , de la PI3K, de la p38 MAP kinase et des phosphatases sur la phosphorylation de 4E-P1 stimulée par AII dans les CMLA.....	72
Figure 3: Effets d'inhibiteurs pharmacologiques de différentes voies de signalisation cellulaires sur la phosphorylation de 4E-BP1 stimulée par AII (A) et sur l'association entre 4E-BP1 et eIF4E (B) dans les CMLA.....	76
Figure 4: Effets d'inhibiteurs de différentes voies de signalisation sur les cartes phosphopeptidiques de 4E-BP1 stimulée par AII dans les CMLA.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$^{32}\text{P}_i$	Phosphate inorganique radioactif
4E-BP1	4E Binding Protein 1
4E-BP2	4E Binding Protein 2
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Ang II	Angiotensine II
AKT	Produit du proto-oncogène <i>v-akt</i> /protéine kinase B
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
Ca^{2+}	Calcium
CKII	Caséine Kinase II
CMLA	Cellules de Muscles Lisses Aortiques
CMLV	Cellules de Muscles Lisses Vasculaires
CPK	Cytosolic Protamine Kinase
CSF	Colony-Stimulating Factor
DAG	1,2-DiacylGlycérol
DUP 753	(2-butyl-4-chloro-1-[(2'-(1H-tetrazol-yl) biphenyl-4-yl)-methyl]-5-(hydroxymethyl) imidazol (Losartan)
eEF	eukaryotic Elongation Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF	eukaryotic Initiation Factor
eIF4E	eukaryotic Initiation Factor 4E
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
ET	Endothéline
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKBP	FK-506 Binding Protein
FRAP	FKBP12-Rapamycin Associated Protein

Gbr2	Growth-factor-receptor-binding protein 2
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
HSP	Heat-Shock Protein
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IP ₂	1,4-Inositol biPhosphate
IP ₃	1,4,5-Inositol Trisphosphate
JNK	Jun N-terminal Kinase
kDa	kiloDaltons
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase ou MEK
MBP	Myelin Basic Protein
MEK	MAP Kinase Kinase ou ERK Kinase
MEKK	MEK Kinase ou MAP Kinase Kinase Kinase
MKP1	MAP Kinase Phosphatase 1
MNK1	MAP Kinases Interacting Kinase 1
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NGF	Nerve Growth Factor
p125 ^{FAK}	p125 Focal Adhesion Kinase
p38/RK	Reactivating Kinase
p65 ^{PAK}	p65 p21-Activated Kinase
p70 ^{S6K}	p70 S6 Kinase
p90 ^{RSK}	p90 Ribosomal S6 Kinase
PA	Acide Phosphatidique
PC	PhosphatidylCholine
PD 98059	[2-(2'-amino-3'methoxyphenyl-oxanaphtalen-one]
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Récepteur du PDGF
PHAS-I	Phosphorylated Heat and Acid Stable protein regulated by Insulin
PI3K	PhosphatidylInositol-3 Kinase
PIP ₂	PhosphatidylInositol bisPhosphate
PKA	Protéine Kinase AMPc-dépendante

PKC	Protéine Kinase C
PLA ₂	PhosphoLipase A ₂
PLC	PhosphoLipase C
PLD	PhosphoLipase D
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
Pyk2	Tyrosine kinase Ca ²⁺ -dépendante
RAFT1	Rapamycin-FKBP Target 1
Ras	p21 ^{RAS} , protéine G monomérique
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RF	Release Factor
RSK	Ribosomal S6 Kinase
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SDS-PAGE	Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Shc	SH2-domain-containing α 2-collagen-related
SMC	Smooth Muscle Cells
Sos	Son of sevenless
SRA	Système Rénine-Angiotensine
SRC	tyrosine kinase p60 ^{SRC}
TGF β	Transforming Growth Factor β
Tyk2	Janus kinase

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Sylvain Meloche, pour m'avoir permis de travailler au sein de son équipe formidable et surtout pour tout ses précieux conseils, son aide grandement appréciée et ses encouragements. Je voudrais particulièrement le remercier pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de mon séjour dans son laboratoire et pour son dévouement envers tous et chacun.

Un merci tout à fait spécial à mes parents et à Stéphane, sans qui, je ne serais pas arrivée à cette étape. Leur compréhension, leur soutien, leurs encouragements et leur patience m'ont permis d'atteindre mes objectifs. Je vous adore.

Merci énormément à Denise, Régis et à mes amis dont la présence et le support tout au long de mes études ont grandement été appréciés. Je vous aime énormément.

J'ai eu la chance de rencontrer lors de ce projet des collègues de travail extraordinaires qui sont maintenant de merveilleux amis. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Jean-Claude Sciméca (mon petit français adoré), Johanne Pellerin (JohP), Edith Giasson (Caliméro), Laure Voisin, Marc Saba El Leil, Marc Servant (Marcus) et Sonia Girouard pour tout le bonheur que j'ai pu partager en travaillant à leur côtés et leur présence qui m'était très importante.

À tous les autres membres du laboratoire (Kailesh Gopalbhai, Sylvain Foisy, Bruno Gingras, Constantin Makris, Dr. Guo) pour leur soutien moral et technique et tout les agréables journées et soirées passées en leur compagnie.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation de ce projet et à l'écriture de ce mémoire, tout particulièrement Laure Voisin, Marc Servant, Maryse Mercier et Elizabeth Péres Nault pour leur aide tant appréciée.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A. Angiotensine II:

I. **Caractéristiques:**

L'angiotensine II (AII) est le médiateur principal du système rénine-angiotensine (SRA) {1,2}. La fonction principale du SRA est de maintenir l'équilibre hydro-électrolytique du corps humain face à tout stress ou autres stimuli. Son rôle est de contrôler la balance sodium/eau ainsi que la pression sanguine.

La réaction conduisant à la formation de l'hormone octapeptidique AII débute par la transformation du précurseur d'origine hépatique, l'angiotensinogène, en angiotensine I, un décapeptide inactif, via un clivage enzymatique par la rénine. L'angiotensine I est ensuite convertie en AII grâce à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) {3}. Ces réactions enzymatiques se produisent notamment au niveau du plasma, des reins, du cerveau, des glandes surrénales, des ovaires ainsi qu'au niveau tissulaire {4}. L'AII est donc produite de façon systémique et locale {3}.

II. **Rôles majeurs de l'angiotensine II:**

1. Actions biologiques et physiologiques de l'angiotensine II:

L'AII était originalement caractérisée comme un octapeptide possédant une puissante activité de vasoconstricteur au niveau du système vasculaire {5}. L'AII est maintenant reconnue comme une hormone peptidique multifonctionnelle qui exerce une multitude d'actions biologiques au niveau des systèmes cardiovasculaire, rénal, nerveux central et périphérique {2}. Ses effets touchent également d'autres tissus cibles tels que les glandes surrénales, le foie et les gonades {5}. L'AII stimule une variété de réponses physiologiques qui permettent de maintenir, entre autre, la pression sanguine artérielle et les fonctions rénales {6}.

Le contrôle de la pression artérielle est assuré par l'action vasoconstrictrice de l'AII sur l'ensemble du réseau artériel tant périphérique que coronaire. Certaines fonctions cellulaires périphériques comme la réabsorption rénale de sodium, la contraction des

myocytes cardiaques et des cellules musculaires lisses sont également contrôlées par cette hormone.

L'AII stimule par ailleurs la libération d'aldostérone par la glande surrénale, de peptides vasoactifs par l'endothélium vasculaire et de catécholamines au niveau du système nerveux autonome sympathique {1,2,7}. Ces fonctions contribuent à maintenir l'homéostasie vasculaire lors de stress tels qu'une hémorragie, une déshydratation ou encore simplement un changement de posture {6}. L'AII empêche également la recapture de la noradrénaline au niveau post-synaptique. En plus des effets périphériques d'AII sur la régulation cardiovasculaire et sur l'homéostasie des fluides, l'AII agit au niveau du système nerveux central, pour régler la pression sanguine, certaines sécrétions hormonales (vasopressine, catécholamine), la soif et le comportement {1,5}.

L'AII induit une hypertrophie cellulaire accompagnée d'une augmentation de la synthèse d'acide ribonucléique (ARN), d'une synthèse de protéines ainsi qu'un accroissement de la taille et du contenu des cellules. Cependant, l'AII ne provoque pas d'hyperplasie puisqu'aucune augmentation de la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) ni du nombre de cellules a été observée {8-12}.

2. Effets de l'angiotensine II sur la croissance cellulaire:

L'AII stimule la croissance de plusieurs types cellulaires tel que, les CMLV, cellules corticosurrénales, fibroblastes, myocytes cardiaques, cellules mésangiales, cellules endothéliales et les cellules de la microvascularisation coronaire {8,11,13,14}.

La paroi vasculaire est un organe actif, composé de cellules endothéliales, de CMLV, et d'autres types de cellules selon le segment vasculaire spécifique (ex: fibroblastes). Cette paroi n'est pas statique et ses composantes vasculaires augmentent de façon dynamique et/ou se réorganisent en réponse aux stimuli physiologiques ou pathologiques {15}. Les CMLV constituent la principale composante des vaisseaux

sanguins, représentant la voie convergente des divers changements dynamiques de la structure de la paroi vasculaire {12}. Bien que parfois bénéfiques, les changements de la structure vasculaire mènent souvent à des pathologies cardiovasculaires {15}. Par conséquent, beaucoup d'efforts sont apportés pour élucider les mécanismes qui contrôlent la croissance et la production de la matrice extracellulaire par les CMLV. Le traitement des CMLV par l'AII augmente la production locale de facteurs autocrines et paracrines tels que le TGF β (*transforming growth factor- β*), le PDGF (*platelet derived growth factor*) et l'ET (endothéline), ce qui suggère que l'AII peut aussi affecter la croissance cellulaire de façon indirecte {15,16}.

3. Pathologies:

Les pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, l'angiogénèse et la resténose sont caractérisées par une croissance aberrante des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) {6,11,14,17-20}. L'AII est impliquée dans le contrôle de la croissance des CMLV, ce qui lui confère un rôle considérable au niveau de ces pathophysiologies vasculaires, rendant ainsi très importante l'étude du rôle, des actions et des implications de cette hormone {17}.

III. Récepteurs de l'angiotensine II:

1. Caractéristiques des récepteurs AT₁ et AT₂ (voir Tableau I):

Les effets physiologiques d'AII dépendent de la liaison de l'hormone avec des récepteurs spécifiques. Deux sous-types de récepteurs pharmacologiquement distincts, nommé AT₁ et AT₂, ont été identifiés à l'aide d'antagonistes non-peptidiques sélectifs, c'est-à-dire, le DUP 753 pour AT₁ et le PD 123319 pour AT₂ {1}.

La distribution de ces récepteurs varie en fonction de l'espèce. Au stade adulte, chez l'homme, le singe, le lapin, le boeuf et le rat, le récepteur AT₁ est majoritaire dans un grand nombre de tissus ou d'organes, particulièrement au sein du système cardiovasculaire (aorte, artères pulmonaire et rénale, muscle lisse vasculaire, coeur)

Tableau I :

Propriétés des sous-types de récepteurs de l'angiotensine II:

	AT ₁	AT ₂
Ordre de puissance	Saralazine > All > Alll	Alll ≥ All ≥ Saralazine
Antagonistes sélectifs	Losartan (DuP 753); EXP3174; DuP 532; L-158809; SK&F 108566; GR117289; TCV-166	PD123177; PD123319; PD121981; PD124125
Effets des agents réducteurs	Inactivation	Augmentation
Couplage aux protéines G	Oui	Oui/Non
Voies de signalisation	↓Adénylyl cyclase ↑PLC ↑PLA ₂ ↑PLD ↑Phosphorylation de tyrosine	↓GMPc ↑PLA ₂ ↑↓Tyrosine phosphatase
Structure	359 acides aminés 7 domaines transmembranaires	363 acides aminés, 7 domaines transmembranaires
Masse moléculaire	≈ 60 kDa	≈ 70 kDa

All = angiotensine II; Alll = angiotensine III.

Tableau tiré de Chassagne et coll., 1996 {1}.

ainsi qu'au niveau des poumons, du cortex rénal et surrénalien, du cerveau et du foie. Le sous-type AT₂, dont la synthèse est restreinte, se retrouve, en plus faible quantité, dans la médullosurrénale, l'appareil reproducteur féminin ainsi que dans certaines régions définies du cerveau {9,21,22}. Par contre, AT₂ serait le sous-type majeur exprimé dans les cellules musculaires lisses embryonnaires et néonatales {9}.

Le sous-type AT₁ est responsable de la grande majorité des effets physiologiques classiques de l'AII, dont les effets trophiques (la stimulation de la croissance de plusieurs types cellulaires et la stimulation de la synthèse de protéines), les effets vasoconstricteurs, ainsi que les effets sur les systèmes endocrine et nerveux central {7,21}. Le récepteur AT₂ pourrait jouer un rôle au niveau des fonctions cérébrales et de la reproduction chez l'adulte {9,21} ainsi que dans la modulation des effets anti-prolifératifs et vasodilatateurs de l'AII. Le sous-type AT₂ a été impliqué dans le phénomène d'apoptose, dans l'activation d'une tyrosine phosphatase et dans les effets anti-prolifératif de l'AII {23-25}.

Les récepteurs AT₁ et AT₂ contiennent, respectivement 359 et 363 acides aminés. Ils appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont généralement caractérisés par leur couplage aux protéines G hétérotrimériques composées de trois sous-unités hétérologues, α , β and γ {1,7}. L'affinité de liaison du sous-type de récepteur AT₂ pour l'AII est plus élevée qu'elle est celle du sous-type AT₁. Ces deux sous-types de récepteurs sont fonctionnellement distincts avec seulement 30% d'homologie de séquence {6,26-28}. Le récepteur AT₂, bien qu'il appartienne à la même famille de récepteur qu'AT₁, est couplé aux protéines G dans certains systèmes {1}. Le mode de transmission du signal du récepteur AT₂ est atypique comparativement aux autres RCPG.

L'élucidation, par clonage moléculaire, de la structure du récepteur AT₁ a été réalisée en premier lieu par Murphy et coll. (1991) {26} et Sasaki et coll. (1991) {27}, alors que la structure d'AT₂ a été résolue en 1993 par Inagami et coll. {22,28}. A la suite

du clonage moléculaire d'AT₁, l'isoforme AT_{1B} a été identifié chez le rat et la souris {22}. Les deux isoformes AT_{1A} et AT_{1B}, retrouvés chez les rongeurs, sont très similaires puisqu'ils partagent 95% d'homologie au niveau de la séquence protéique {29,30}. Le génome humain ne contient quant à lui, qu'un seul gène codant pour le récepteur AT₁, ce qui est également le cas pour le récepteur AT₂ {1}.

IV. Mécanismes de signalisation:

Les voies de signalisation relient les événements modulés par les récepteurs à la surface de la cellule aux perturbations intracellulaires, allant des dommages causés à l'ADN, aux changements de structure du cytosquelette, en passant par le transport des vésicules et l'altération de l'activité des facteurs de transcription {31}. Plusieurs voies de signalisation sont connues et un grand nombre de composantes qui relient les récepteurs extracellulaires aux machineries de transcription et de traduction ont été caractérisées. Nombre d'entre elles fonctionnent par le biais de cascades de phosphorylation {32}. Il est important d'identifier les voies de signalisation responsables de la phosphorylation des facteurs d'initiation de la traduction, des facteurs de transcription et des différentes composantes de la machinerie cellulaire. Cela devrait permettre d'éclaircir les mécanismes d'action des stimuli extracellulaires et des proto-oncogènes qui affectent la prolifération cellulaire {32}.

1. Les familles de récepteurs:

Les stimuli extracellulaires exercent leurs différents effets sur la croissance cellulaire par la liaison à des récepteurs spécifiques localisés à la surface de la cellule qui entraînent leur activation. Ces récepteurs peuvent être, entre autre, des récepteurs tyrosine kinases (RTK), des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), des récepteurs sérine/thréonine kinases, des récepteurs de cytokines {32}.

Plusieurs récepteurs associés aux hormones ou aux facteurs de croissance possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque {33,34}. L'activation des récepteurs tyrosine kinase à la surface de la cellule, par la liaison de ligands spécifiques, stimule l'hom-

ou l'hétéro-dimérisation du récepteur et/ou un changement conformationnel qui résulte en une autophosphorylation de multiples résidus tyrosine dans la portion cytoplasmique du récepteur {31}. La dimérisation du récepteur peut être accomplie par un ligand dimérique tel que le PDGF ou monomérique comme l'EGF (*epidermal growth factor*). Une des premières tyrosine à s'autophosphoryler dans le récepteur du PDGF est située dans le domaine d'activation de la kinase, ce qui accentue son activité.

Les récepteurs couplés aux protéines hétérotrimériques liant le guanosine triphosphate (GTP), appelées protéines G, constituent la grande famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires et modulent les réponses cellulaires en utilisant diverses molécules de signalisation. L'élément de base du RCPG est composé de trois parties: tout d'abord le récepteur qui lie le ligand du milieu extracellulaire; la protéine G hétérotrimérique composée de sous-unités identifiées $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, ainsi que l'effecteur qui interagit avec les sous-unités dissociées pour moduler l'effet intracellulaire {35}. Malgré la diversité de ligands avec lesquels ils interagissent, les RCPG partagent une structure tertiaire conservée caractérisée par sept domaines transmembranaires reliés par des boucles intracellulaires et extracellulaires. Les trois sous-unités α , β et γ des protéines G sont assemblées de façon stable lorsqu'il y a liaison de guanosine diphosphate (GDP). L'interaction non-covalente entre le ligand et le récepteur lié à la protéine G mène à l'échange du GDP pour le GTP qui se lie à $G\alpha$, occasionnant ainsi son détachement de l'hétérodimère stable $G\beta\gamma$ qui lui est attaché à la membrane cellulaire. Il en résulte la formation de deux unités, $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ capables de régler la signalisation intracellulaire {35}. La sous-unité $G\alpha$ est active seulement lorsqu'elle est liée au GTP et peut être inactivée par une GTPase intrinsèque qui catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui représente l'étape limitante {31}. La réassociation subséquente de $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ provoque l'inactivation de la protéine G {35}.

La stimulation du récepteur AT_1 par la liaison d'AII active de nombreuses voies de signalisation via au moins deux classes de protéines G {1}. Les événements de

transmission du signal sont similaires à ceux observés lors de la stimulation par des mitogènes ou par des cytokines et incluent l'activation de la voie de la phospholipase C (PLC) {7,36}, de la phospholipase D (PLD), de la phospholipase A₂ (PLA₂), la mobilisation du calcium (Ca²⁺) {37}, l'activation de la protéine kinase C (PKC) {7,38}, la phosphorylation de protéines en tyrosine {18,39}, l'activation de protéines kinases dont les MAP (*mitogen-activated protein*) kinases et la p70 S6 kinase {7,22,40} ainsi que l'induction de proto-oncogènes {7,41}. La figure 1 représente schématiquement les mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteurs AT₁. Ces différentes voies de signalisation seront abordées dans les prochains paragraphes et sont bien illustrées par cette figure {1}.

2. Voie des phosphoinositides:

L'implication des phosphoinositides dans la signalisation cellulaire a été mise à jour en 1953. En 1975, Robert Michell suggérait que certaines hormones et transmetteurs, qui agissent au niveau de récepteurs à la surface de la cellule mais n'activent pas l'adénylate cyclase, exerçaient leurs effets en accentuant le taux de renouvellement des phospholipides inositol {5}. Suivant cette hypothèse, le premier événement de signalisation constitue donc l'hydrolyse du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂) produisant ainsi deux seconds messagers. La figure 2 résume les événements de la voie de signalisation des phosphoinositides stimulés par le récepteur AT₁.

La cascade d'événements menant à cette hydrolyse du PIP₂ débute par la liaison d'un agoniste à son récepteur membranaire couplé aux protéines G, par exemple, lorsque l'AII se couple au récepteur AT₁. Cette voie de signalisation est la principale et également la mieux connue pour la transmission du signal impliquant l'AII. Ainsi, lors de la liaison de l'AII au récepteur AT₁, la PLC-β est activée via une protéine G_q, l'hydrolyse du PIP₂ se produit, ce qui génère deux seconds messager, le 1,4,5-inositol trisphosphate (IP₃) et le 1,2-diacylglycérol (DAG) qui vont activer des voies de signalisation différentes.

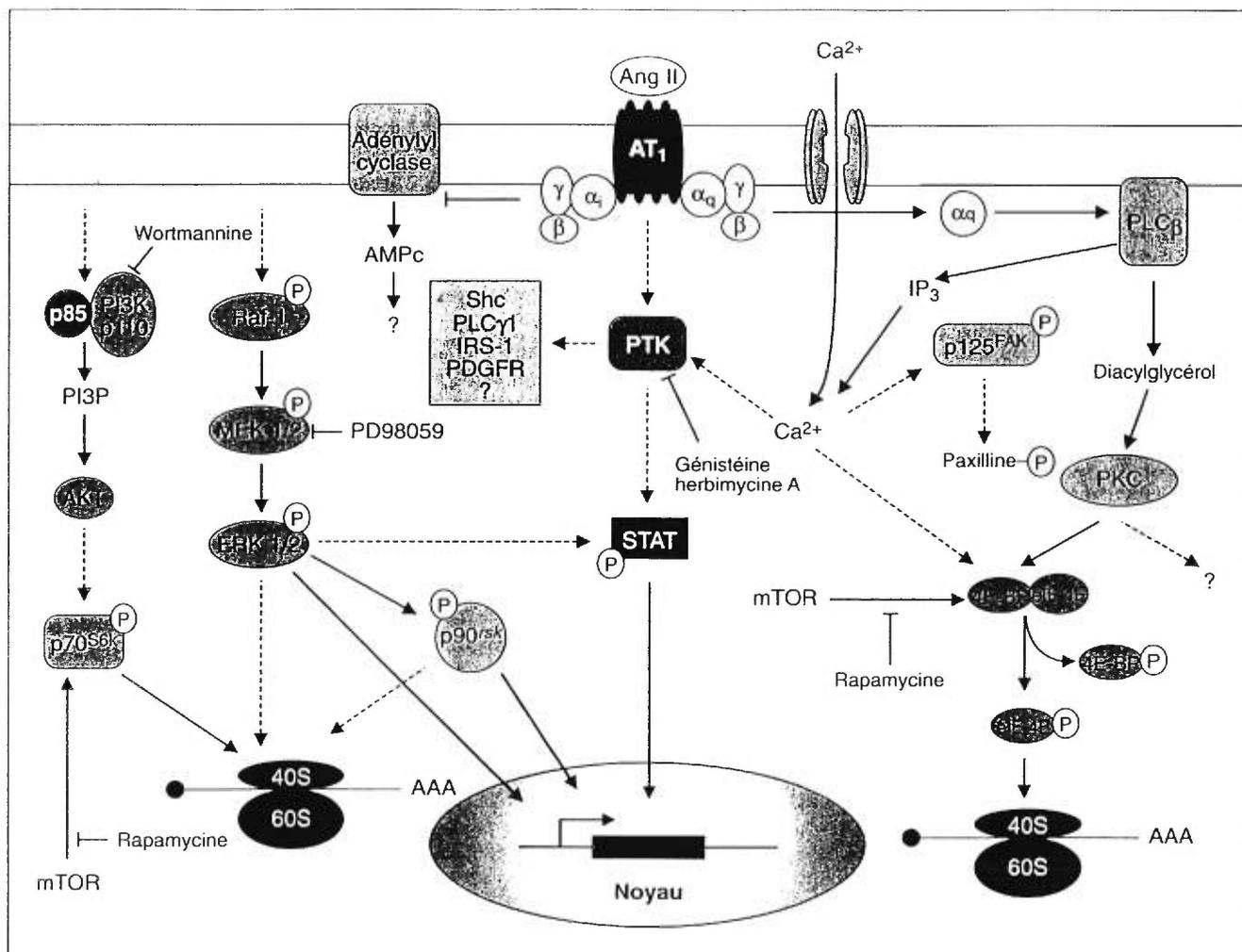


Figure 1: Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteur AT₁.

Schéma tiré de Chassagne et coll. 1996 {1}.

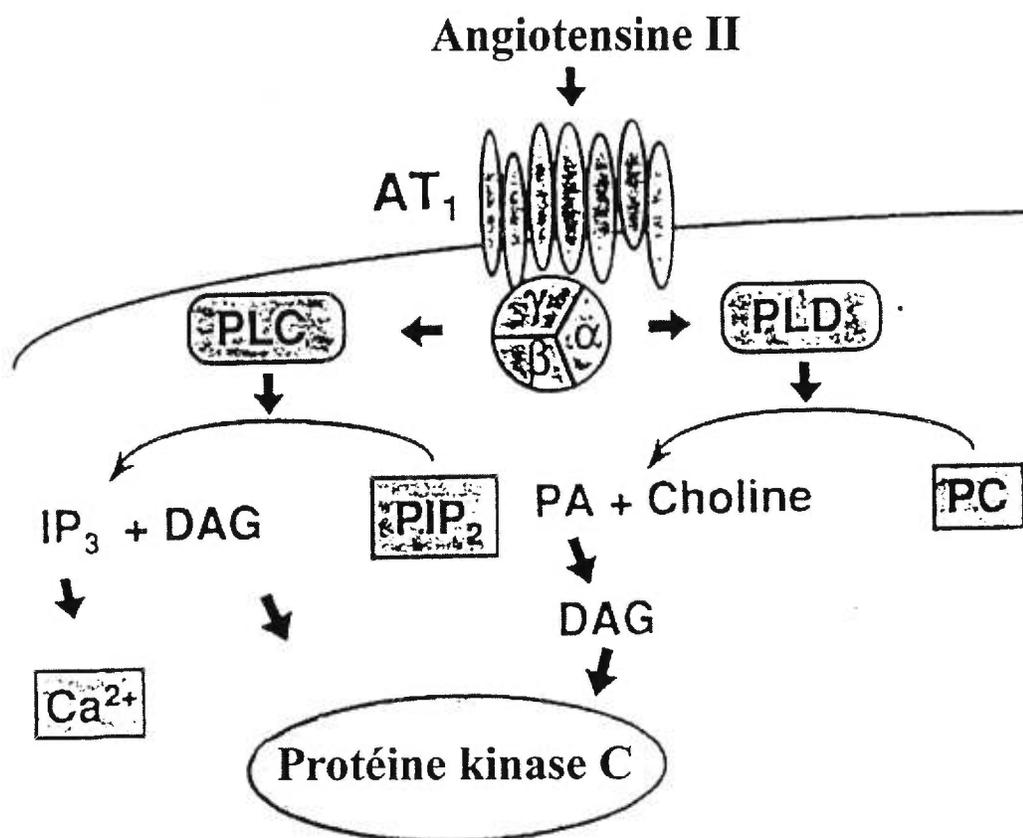


Figure 2: Voie de signalisation classique des phosphoinositides stimulée par l'angiotensine II via le récepteur AT₁ dans les cellules de muscle lisse vasculaire.

Schéma adapté de Duff et coll., 1995 {14}.

La formation d'IP₃ stimule la libération du Ca²⁺ intracellulaire. En effet, l'IP₃ se lie à son récepteur qui constitue un canal calcique situé dans la membrane du réticulum endoplasmique de plusieurs types cellulaires dont les CMLV {42}. L'augmentation rapide et transitoire {5} de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire active une variété de réponses cellulaires, comme la synthèse et sécrétion d'aldostérone {43} et la vasoconstriction {44}. L'élévation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ est également associée à la stimulation de la synthèse de protéines dans plusieurs systèmes et l'AII a besoin de cette augmentation pour induire la synthèse de protéine {45}.

Le DAG quant à lui, peut effectuer deux rôles distincts au niveau de la signalisation cellulaire. Il peut tout d'abord être clivé pour produire l'acide arachidonique, qui peut être considéré également comme un second messenger, il peut agir comme précurseur dans la synthèse des eicosanoïdes {5}. Le DAG active aussi directement les PKC (protéine kinase C), une famille de sérine/thréonine kinases cytoplasmiques qui s'associent à la membrane plasmique une fois activées {36}. La famille des PKC phosphoryle les protéines sur les résidus sérine et thréonine et modifie ainsi leur activité {7}. Les PKCs représentent une famille multigénique d'isoformes qui ont été classifiées en trois sous-familles. Tout d'abord, la sous-famille des cPKCs (conventionnelle) dépendante du calcium et la sous-famille des nPKCs (nouvelle) insensible au calcium sont toutes deux modulées par les phospholipides, telle que la phosphatidylsérine, le DAG et les esters de phorbol, tel que le PMA. Il y a finalement la troisième sous-famille, les PKC atypiques (aPKCs) qui sont insensibles aux DAG, aux esters de phorbol et au calcium. Le DAG est rapidement métabolisé et ne peut être responsable de l'activité de la PKC lors d'une réponse à long terme comme la différenciation et la prolifération cellulaire. L'activité de la PLC et la production d'IP₃ sont transitoires tandis que l'activité du DAG est biphasique et peut être soutenue grâce à l'implication de la phospholipase D (PLD) qui catalyse le clivage de la phosphatidylcholine, qui constitue le phospholipide majeur de la membrane plasmique, permettant ainsi la prolongation de la réponse cellulaire et la production de DAG dit tardif {42}. En plus de la PLC et PLD, l'AII active également la PLA₂ {5,7} et inhibe

l'activité de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G_i , ce qui a pour effet de diminuer le taux d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) {21,46}.

L'activation de la PKC par l'AII dans les CMLV stimule, entre autre, la contraction de ces cellules. De plus, dans certains types cellulaires, son activation augmente la transcription de gènes spécifiques {38,42}. Des voies de signalisation dépendante et indépendante de la PKC sont impliquées dans la régulation de la croissance des CMLV, indiquant que d'autres voies de signalisation doivent avoir un rôle dans le mécanisme de la transmission du signal de l'AII.

3. L'AMP cyclique:

L'AMPc est un second messager retrouvé dans toutes les cellules procaryotes et eucaryotes étudiées jusqu'à maintenant. Son rôle dans la signalisation intracellulaire est important puisqu'elle est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire de nombreux types de cellules. L'AMPc peut jouer un rôle d'inhibiteur ou de stimulateur de croissance et ce en fonction de l'origine de la cellule et de son stade de différenciation. L'élévation de la concentration d'AMPc intracellulaire stimule entre autre, la prolifération des cellules épithéliales, des hépatocytes et des cellules Swiss 3T3, mais produit l'effet contraire au niveau des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et de certaines cellules tumorales {47,48}.

Les effets de l'AMPc dans la cellule sont attribuables à l'activation de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). La PKA phosphoryle les résidus sérine/thréonine de substrats qui diffèrent d'une cellule à l'autre. Dans sa forme inactive, la PKA possède deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices auxquelles se lie l'AMPc lorsqu'il y a activation, provoquant ainsi la dissociation des sous-unités de la PKA.

Les mécanismes par lesquels l'AMPc module la croissance cellulaire sont encore inconnus. Certaines études ont suggéré que l'AMPc inhiberait la prolifération cellulaire en interférant avec l'activation des MAP kinases. En fait, l'AMPc inhiberait la transmission du signal en empêchant l'activation du signal ras-dépendant provenant de Raf-1 {49}. Une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire inhibe la

synthèse de protéines induite par une stimulation par l'AII dans les CMLV, sans pour autant affecter l'activation des MAP kinases {12}.

4. Les MAP kinases:

La modification covalente de protéines par phosphorylation constitue la principale voie par laquelle les récepteurs à la surface des cellules eucaryotiques transmettent les signaux extracellulaires {33}. Plusieurs processus cellulaires sont modulés par phosphorylation/déphosphorylation. Les divers substrats pour les protéines kinases incluent, entre autre, les enzymes métaboliques, les facteurs de transcription et de traduction, les protéines du cytosquelette, les régulateurs du cycle cellulaire ainsi que d'autres protéines kinases et phosphatases {33}.

4.1. Généralité sur les MAP kinases:

Parmi les protéines kinases les plus importantes, on retrouve la famille des MAP kinases, comprenant les ERKs, JNK/SAPKs et p38. Ces protéines appartiennent à la grande famille des protéines sérine/thréonine kinases. Plus particulièrement, les MAP kinases appartiennent à un groupe de *proline-directed* sérine/thréonine kinases puisque la séquence consensus de reconnaissance pour leurs substrats est souvent composée de la séquence proline-leucine-sérine/thréonine-proline {50-53}. Ces protéines kinases sont activées rapidement en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et la transformation, {31,39,51,53-56} Ce sont des molécules clés dans le processus de signalisation stimulé par les facteurs de croissance et de différenciation ainsi que pour les réactions impliquées dans le cycle cellulaire {34}.

Dans les cellules eucaryotes, il existe deux homologues des MAP kinases de la sous-famille ERK bien caractérisés, nommés p44^{mapk} (ERK1) et p42^{mapk} (ERK2), qui sont retrouvés et exprimés de façon ubiquitaire dans les cellules {57-61}. Ces protéines sont hautement homologues aux kinases SLT2, KSS1 et FUS3 de levure {58}.

4.2. Activation et inactivation de la cascade des MAP kinases:

Les MAP kinases existent sous la forme déphosphorylée dans les cellules au repos ou non-stimulées et deviennent actives seulement après avoir été phosphorylées sur des résidus tyrosine (tyr, Y) et thréonine (thr, T). Ce type de phosphorylation double leur confère un caractère unique. Le site de phosphorylation se situe sur un phosphopeptide unique, séparé par seulement un résidu et selon une séquence régulatrice commune à toutes les ERKs, c'est-à-dire, -TEY-, où E représente le glutamate {34,58,62,63}. La phosphorylation de ces deux résidus provoquerait des changements conformationnels permettant ainsi l'accès du substrat au site de liaison et l'activation des MAP kinases {64}. ERK3 constitue la troisième isoforme connue de la famille de ERK. Cette protéine de 63 kDa possède une séquence régulatoire différente de ERK1 et ERK2 (c'est-à-dire -SEQ- plutôt que -TEY-, où S représente une sérine).

Moins directement reliée à ERK1/2, les membres de la famille des JNK/SAPKs (*Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase*), sont impliqués dans la réponse des cellules au stress plutôt qu'aux facteurs de croissance {31,65-68}.

Plus récemment, une autre famille de protéines kinases activées par une variété de stress environnementaux a été identifiée. Nommées p38/RK/MPK2/p38 β , elles semblent avoir une spécificité différente pour leur substrat que ERK1 et ERK2 {64}. Bien que JNKs et p38s semblent être réglées de façon concordante, elles sont activées par deux cascades d'événements différents {69}.

Collectivement, ERKs, JNKs et p38 kinase sont reconnues comme des MAP kinases, possédant des séquences qui s'apparentent et démontrant un mode d'activation commun, c'est-à-dire, une phosphorylation double en thr/tyr {69}.

L'activation des MAP kinases fait partie d'une cascade complexe de protéines kinases et dépend de la phosphorylation par une enzyme unique à double spécificité appelée MEK ou MAP kinase kinase (MAPKK) {58,70}. La figure 3 résume les événements de la cascade des MAP kinases stimulée par les facteurs de croissance et l'AII dans la CMLV {14}. La protéine kinase MEK, qui est retrouvée sous deux types d'isoformes nommés MEK1 et MEK2, démontre une très haute spécificité pour les MAP kinases

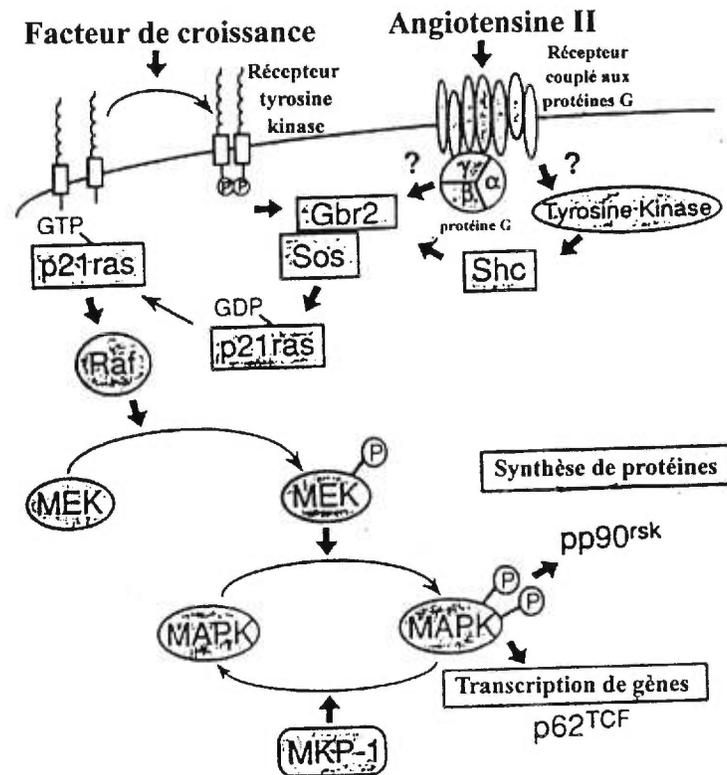


Figure 3: Stimulation de la voie des MAP kinases par les facteurs de croissance et par l'angiotensine II dans les cellules de muscle lisse vasculaire.

Schéma adapté de Duff et coll., 1995 {14}

ERK et ne possède aucun autre substrat connu à ce jour. Cette enzyme ne reconnaît pas ERK dénaturée, pas plus que les peptides dérivant de ERK {33}. L'activation de MEK est nécessaire et suffisante pour induire une prolifération ou une différenciation cellulaire induite par la stimulation par des facteurs de croissance {31}. MEK est contrôlée positivement par phosphorylation en ser/thr et est inhibée par l'action de la phosphatase 2A qui déphosphoryle les résidus ser/thr {70}.

Raf-1 est une sérine/thréonine kinase, exprimée de façon ubiquitaire, normalement localisée dans le cytosol, où elle est associée aux protéines HSP90 et HSP50 (*heat-shock protein 90 et 50*). Ces dernières semblent stabiliser la kinase et favoriser une bonne interaction avec la protéine p21^{RAS}. La protéine Ras sert à recruter Raf-1 à la membrane puisque, l'activation de Raf-1 nécessite une interaction avec la membrane plasmique et la phosphorylation d'acides aminés clés {31,33}. Raf-1 est également réglée par phosphorylation sur des résidus ser/thr, lequel est induit par l'AII dans les CMLV. La protéine Ras détient un rôle important dans la prolifération normale des cellules, la différenciation et la tumorigénèse {50}.

4.3. Rôle des MAP kinases:

En réponse à un stimulus mitogénique extracellulaire l'activation de ERK1/2 est rapide et biphasique avec un premier pic à 5 minutes, un retour au niveau de base après 30 minutes et un second pic entre 1 et 2 heures, démontrant ainsi l'importance du rôle des phosphatases {14}. Dans certaines cellules, l'activation est par ailleurs soutenue pendant plus de 4 heures {61}. Un des résultats nets de l'activation de la cascade de ERK est une induction de gènes précoces immédiatement transcrits menant à la prolifération ou la différenciation cellulaire {71,72}. Les agents non-mitogéniques tels que l'AII, stimulent les MAP kinases de façon transitoire, suggérant ainsi que la prolifération cellulaire requière une activation soustenue des MAP kinases {40,73-75}. Grâce à des études d'immunofluorescence, il a été possible de déterminer que les MAP kinases sont retrouvées majoritairement dans le cytoplasme dans les cellules au repos.

Cependant, une translocation nucléaire rapide est détectée après stimulation des cellules par les facteurs de croissance. En effet, après une heure de stimulation, ERK1 est majoritairement retrouvée au niveau nucléaire. Cette accumulation est transitoire puisque dès que les facteurs de croissance sont retirés, les MAP kinases retournent vers le cytoplasme. Cette translocation semble caractériser le lien entre la surface de la cellule et le noyau où les gènes sont transcrits {76}. Les MAP kinases peuvent donc phosphoryler des protéines nucléaires qui codent pour des facteurs de transcription, tels que p62^{TCF} /Elk-1, impliqués dans l'activation de gènes précoces comme *c-fos* qui affectent la régulation de la croissance {8,14,31,35,41,46,77,78}.

Un inhibiteur de la voie des MAP kinases ERK1/ERK2 a été développé récemment par Dudley et coll. {79}. Ce composé, le PD 98059 [2-(2'-amino-3'methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one], inhibe sélectivement l'activation des MAPKK MEK1 et MEK2. L'inhibition de MEK par le PD 98059 empêche l'activation des ERKs et la phosphorylation subséquente des substrats de ces MAP kinases dans les cellules intactes {79}. Cet inhibiteur pharmacologique s'avère donc un bon outil lors d'étude impliquant la phosphorylation par les MAP kinases ERK1 / ERK2 {80}.

ERK1 et ERK2 peuvent être inactivées *in vitro* par l'action de tyrosine ou de ser/thr phosphatases, indiquant ainsi que la phosphorylation sur les résidus thr et tyr est nécessaire à l'activation complète de l'enzyme {31}. La tyrosine phosphatase CD45, la ser/thr phosphatase 2A et la phosphatase à double spécificité MKP1 (*MAP kinase phosphatase 1*) peuvent inactiver ERK1 et ERK2 *in vitro* {33,64}.

La phosphatase MKP1 semble très intéressante étant donné sa double spécificité. MKP1 est très sensible à la dégradation et déphosphoryle les résidus thréonine et tyrosine des MAP kinases de façon spécifique {31,33}. Cette protéine nucléaire est induite rapidement et transitoirement par une variété de stimuli tels que les facteurs de croissance, le stress et l'augmentation d'AMPc {31}. Il a été établi que l'Ang II stimule l'expression de l'ARNm et la synthèse de MKP1 {81} et l'inhibition de cette

phosphatase maintient l'activation des MAP kinases dans les CMLV {82}. Cependant de plus récentes informations semblent indiquer que dans les CMLV, MKP1 ne soit pas la phosphatase inactivant ERK après 5 à 10 min de stimulation puisque à ces temps, la phosphatase n'est pas encore détectable dans les cellules. Une dérégulation de la balance kinase-phosphatase peut résulter en une multitude d'effets sur la croissance, incluant la prolifération et l'apoptose {11,83}.

En plus de l'action de phosphatases, l'inactivation des MAP kinases peut s'effectuer par la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs membranaires impliqués. Cette diminution d'activité des MAP kinases peut également résulter d'une action rétroactive négative par le jeu de phosphorylation/déphosphorylation de la cascade ERK {31}.

La régulation de la prolifération cellulaire par les facteurs de croissance dans les cellules eucaryotiques non-transformées se produit dans à niveaux dans le cycle cellulaire: tout d'abord, au niveau de la transition entre le stade quiescent (G0) vers la phase G1 et deuxièmement, au niveau de la progression à travers les différentes sous-phases de G1 {84}. Le fait que les MAP kinases soient rapidement activées dans les cellules quiescentes stimulées par des facteurs de croissance suggère une implication possible dans la transition des phases G0 à G1. L'activité de ERK1 et ERK2 est restreinte à la phase G1 du cycle cellulaire et l'entrée en phase S des fibroblastes, est associée avec leur inactivation, indiquant que la réplication de l'ADN ne requière pas l'activité des MAP kinases. Cette activité soutenue des MAP kinases durant la progression dans le cycle cellulaire et l'inactivation à la transition G1 à S représentent deux processus de régulation impliqués dans la réponse proliférative de la cellule face aux signaux mitogéniques {70}. Cette activation pourrait également constituer un facteur de décision pour la cellule entre l'option d'initier le cycle cellulaire et celle de se diviser ou encore celle de sortir du cycle et de se différencier{33}.

Le rôle précis de la cascade des MAP kinases n'est pas encore très clair, mais son implication dans la phosphorylation et la régulation de nombreuses composantes

cellulaires a été démontrée. Les nombreux substrats de ERK1/2 sont cytoplasmiques et nucléaires et correspondent à des protéines associées à la membrane comme le récepteur de l'EGF, à des molécules de signalisation telle que la phospholipase 2A cytosolique, à des facteurs impliqués dans la régulation de la synthèse de protéines, à des protéines nucléaires et à de nombreuses autres protéines kinases telles que p90^{rsk} (*ribosomal S6 kinase*) {31,85}.

4.4. Régulation croisée entre la voie des ERKs et autres voies de signalisation:

L'organisation hiérarchique des voies MAP kinases explique les nombreuses possibilités d'interactions à l'intérieur d'une même voie ou de différentes voies de signalisation entre elles. En effet, il est possible d'établir un lien entre les voies ERKs et les voies de signalisation de l'AMPc. Dans certain type cellulaire, tels que les fibroblastes et les cellules musculaires lisses, l'élévation d'AMPcyclique suite à l'activation de la PKA, inhibe la prolifération cellulaire et l'activation de la cascade des MAP kinase en réponse à la stimulation, par des facteurs de croissance. Au contraire, une stimulation de la prolifération cellulaire et une activation de la cascade des MAP kinases peut être observé au niveau de cellules épithéliales, hépatocytes et Swiss 3T3 {33,86}.

5. Autres protéines kinases:

Il y a plusieurs voies parallèles par lesquelles le signal peut être transmis. Plusieurs cascades de phosphorylation sont activées de différentes façons, en fonction du stimulus particulier et du type cellulaire (ex: phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), PKC, phospholipases, p70^{S6K}, p90^{RSK}). Le degré d'activation d'une voie de signalisation dépend du nombre de récepteurs activés et des effecteurs spécifiques qui sont activés également {31}.

5.1. PI3K:

La PI3K, qui possède deux sous-unités de 85 et 110 kDa, fait partie d'une famille de protéines dont certains membres sont monomériques ou dimériques. La sous-unité catalytique (p110) de cette protéine kinase peut être divisée en trois classes principales

basées sur la spécificité pour le substrat lipidique *in vitro*, la structure et le mode de régulation {87}. Cette enzyme phosphoryle la position 3 sur le sucre inositol des phosphoinositides mais est également une ser/thr kinase qui phosphoryle plusieurs protéines dont sa propre sous-unité régulatrice p85 {31}. La phosphorylation de cette sous-unité régulatrice en tyrosine diminue l'activité de l'enzyme PI3K {31}. L'activation de la PI3K est impliquée dans de multiples réponses biologiques telles que les réarrangements du cytosquelette, la migration cellulaire, la mitogénèse, la différenciation, la protection contre l'apoptose et la stimulation de la synthèse de protéines {87-89}. Plusieurs enzymes sont activées en aval de PI3K dont certaines isoformes de PKC, la p70^{S6K} et la ser/thr kinase AKT qui semble d'ailleurs être une des cibles les plus importantes de PI3K connues à ce jour {87,88}. L'antibiotique wortmannine et le LY 294002 sont deux composés structurellement différents qui inhibent l'activité de la PI3K {90-94}. Dans certains types cellulaires, la wortmannine inhibe en plus l'activation des MAP kinases {90,95,96}.

La protéine ser/thr kinase AKT (aussi appelée protéine kinase B) est un homologue cellulaire de l'oncogène rétroviral *v-akt* qui est activé par la stimulation des récepteurs tyrosine kinase et aussi des RCPG comme le récepteur AT₁ (Giasson, E. et Meloche, S., manuscrit en préparation). La phosphorylation sur des résidus ser/thr semble être critique pour l'activité de AKT, ce qui suggère qu'une ou plusieurs kinases en amont active AKT *in vivo* {87}.

5.2. p70^{S6K} et p90^{RSK}:

Le mécanisme par lequel l'AII augmente la synthèse de protéines n'est pas encore bien compris, mais elle pourrait agir en partie par la stimulation de la phosphorylation de la protéine S6, qui joue un rôle dans le contrôle de la synthèse de protéines {11,17}. La protéine S6 se situe au niveau de la sous-unité 40S du ribosome, ce qui lui permet d'interagir avec directement avec les ARNm. Cette protéine est phosphorylée en réponse à des agents mitogéniques, ce qui corrèle avec l'activation de la traduction et de la croissance cellulaire également, mais également avec le recrutement d'ARNm et ribosome en polysome {97}. Les ribosomes dont la protéine S6 est phosphorylée sont

engagés plus efficacement et en plus grande quantité dans le processus de traduction {98}. De plus, les ARNm qui possèdent une séquence en 5' riche en polypyrimidine sont recrutés plus facilement au ribosome lorsque la protéine S6 est phosphorylée. Quelques hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, entre autre, au niveau de l'interaction directe de la séquence en 5' riche en polypyrimidine ou bien de son interaction avec une protéine liée à cette séquence. Il est également possible que la protéine S6 phosphorylée altère le site de liaison de l'ARNm de façon telle que la sous-unité 40S est en mesure de reconnaître plus efficacement la séquence riche en polypyrimidine {97}. La protéine ribosomale S6 peut être phosphorylée *in vitro*, entre autre par la PKA et la protéine p90^{RSK}, mais la principale kinase de la protéine S6 *in vivo* est la p70^{S6K} qui lui est hautement spécifique {99,100}. Les principaux substrats de la p90^{RSK} sont plutôt des facteurs de transcription et l'activité de cette enzyme est modulée par phosphorylation, en partie contrôlée par la voie des MAP kinases {101,102}.

L'activité de la p70^{S6K} est contrôlée par phosphorylation, suite à la stimulation de récepteurs tyrosine kinase et récepteurs couplés aux protéines G. Dans les cellules quiescentes, cette protéine démontre une faible activité qui est augmentée dès la stimulation par des facteurs de croissance {103,104}. Il existe deux isoformes de cette S6 kinase, tout d'abord une protéine de 70 kDa retrouvée principalement au niveau du cytosol et une autre de 85 kDa retrouvée dans le noyau {105}. La p70^{S6K} semble jouer un rôle critique dans les voies de signalisation menant à l'induction de la synthèse protéique induite par l'AII dans les CMLV puisque l'AII stimule puissamment la phosphorylation et l'activation de cette enzyme dans ces cellules {10,99,100}. La p70^{S6K} est indirectement activée par la PI3K et également par la PLC γ dans certains types cellulaires. De plus, l'activité de p21^{ras} est importante pour l'activation de la p70 S6 kinase. Cette activation semblent être modulée par certaines isoformes de la PKC ou par p65^{PAK} {31,98}. La façon dont le signal est propagé de la PI3K vers la p70^{S6K} n'est pas encore tout à fait élucidé. La protéine mTOR ne semble pas être en amont de PI3K mais plutôt au même niveau et les PLC γ , PKC et AKT

semblent faire partie de cette voie de signalisation {98}.

La rapamycine est un composé immunosuppresseur initialement caractérisé comme un inhibiteur de la progression des cellule dans la phase G1 du cycle cellulaire. Ce composé s'est également avéré un outil puissant pour éclaircir la voie de signalisation réglée par les facteurs de croissance qui mène à l'augmentation de la traduction d'ARNm spécifiques {98}. La rapamycine inhibe l'activité de la p70^{S6K} sans affecter la p90^{RSK} ou encore les MAP kinases {89,90,106}. Une concentration de rapamycine suffisante pour inhiber complètement la p70^{S6K} cause seulement une inhibition mineure de la traduction dans certain système, suggérant que cette protéine kinase n'est pas la seule impliquée dans la stimulation de la synthèse de protéine générale induite par une hormone telle que l'insuline {88}. Cette même dose de rapamycine inhibe de façon importante la synthèse de protéine dans les CMLV {10}. Des études *in vitro* ont démontré que la p70^{S6K} n'était pas la cible principale de la rapamycine mais qu'il s'agirait plutôt de la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) aussi nommée FRAP (*FKBP12-Rapamycin associated protein*) . Cette protéine de 220 kDa est un homologue structurel de la PI3K {107}.

6. Phosphorylation en tyrosine:

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que l'AII induisait une phosphorylation en tyrosine de plusieurs substrats dans les CMLV. Le traitement de ces mêmes cellules avec la génistéine et l'herbimicine A, qui sont des inhibiteurs de tyrosine kinases, a aboli l'effet de stimulation de la synthèse de protéines induit par l'AII {18}. Cette voie de signalisation joue donc un rôle critique dans l'hypertrophie cellulaire des CMLV.

Deux protéines ont été identifiées comme étant les substrats majeurs phosphorylés en tyrosine suite à la stimulation par l'AII dans les CMLV: la p125^{FAK} et paxiline. La p125^{FAK} (*focal adhesion kinase*) est une protéine kinase cytoplasmique retrouvée au niveau des plaques d'adhésion focales de la cellule et la paxilline est une protéine du cytosquelette associée également aux régions d'adhésion focale de la cellule en culture {18}. Les protéines Pyk2 (*focal adhesion-associated kinase*) et Tyk2 (*Janus kinase*),

récemment identifiées, sont également phosphorylées en tyrosine suite à une stimulation par l'AII. {86}

La figure 1 résume les différents mécanismes de transmission du signal dans le contrôle de la synthèse de protéines suite à l'activation du récepteur AT₁ {1}.

B. Synthèse de protéines:

I. Généralité et importance dans la cellule:

Les facteurs de croissance sont responsables du contrôle de la croissance et du développement cellulaire et modulent l'activité de cibles spécifiques {108}. Les mécanismes impliqués dans la croissance et la division cellulaire suite à une stimulation des cellules étaient auparavant envisagés comme étant, tout d'abord, une série de phosphorylations de protéines et atteignant le point culminant par l'activation des facteurs de transcription. Le rôle du contrôle traductionnel au niveau de l'expression des gènes semblait moins souvent considéré comme un événement important. Il est maintenant reconnu que la transmission des signaux, au niveau de la régulation de la croissance, implique directement la modulation de la vitesse globale de traduction. La croissance et la division cellulaire sont intimement reliées au contrôle de la synthèse protéique {109}.

La synthèse de protéines est un des principaux processus métaboliques de la cellule eucaryotique. Presque toutes les activités catalytiques de la cellule sont réalisées par des protéines, le taux de synthèse protéique a donc un impact sur tous les aspects du métabolisme cellulaire {110}. La synthèse de protéines est une partie intégrale de la voie de l'expression génique et procure une importante contribution à la modulation de l'expression de gènes spécifiques. Étant un consommateur majeur d'énergie dans la cellule, la synthèse protéique doit être intégrée dans l'ensemble de l'activité métabolique de la cellule et ce, en contrôlant la vitesse de synthèse globale {111}.

Le traitement de cellules quiescentes par des mitogènes induit une réentrée des cellules dans le cycle cellulaire qui s'accompagne d'une augmentation de la synthèse d'ARN, de protéines et d'une duplication de la masse protéique avant la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Une augmentation générale du taux de traduction est requis pour l'entrée et le transit dans le cycle cellulaire {32,98,112,113}, suggérant que l'activation de la traduction est un événement important dans la réponse mitogénique {114}. La réentrée de cellules au repos (G0) dans le cycle est effectuée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires activant de multiples voies de signalisation, qui augmentent le taux de transcription et de traduction stimulant ainsi la prolifération cellulaire {32}. En fait, même une faible inhibition de la synthèse de protéines cause une accumulation de fibroblastes en phase G1 {98}. Le contrôle de la synthèse de polypeptides joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et le taux de traduction reflète généralement l'état de croissance des cellules eucaryotes en culture {108}. Le taux de synthèse protéique augmente donc en réponse aux facteurs de croissance, hormones et mitogènes, impliquant ainsi des événements de signalisation transmembranaires dans le contrôle traductionnel {98,115}.

II. Étapes et mécanismes de la traduction:

Le mécanisme de traduction de l'ARN messager se divise en trois phases: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chaque phase est réalisée grâce à l'action de facteurs protéiques solubles qui interagissent transitoirement avec les ribosomes, l'ARNm et l'ARNt-aminoacyl. Ces facteurs sont nommés facteurs eucaryotiques d'initiation (eIF pour *eukaryotic Initiation Factor*), d'élongation (eEF pour *eukaryotic Elongation Factor*) et de relargage (RF pour *Release Factor*) {114}. L'étape limitante de la synthèse protéique est généralement l'initiation de la traduction {98,111}. Cette étape représente le lieu majeur de la régulation de la synthèse de protéines et ce particulièrement par la phosphorylation des facteurs d'initiation. Des perturbations dans l'étape d'initiation de la synthèse de protéine affectent profondément la croissance et le phénotype cellulaire {109}.

L'activité des eEF est également soumise à une régulation par phosphorylation mais le

rôle de cette phase est moins bien défini {114}. Étant donné le rôle central que joue la traduction des ARNm dans le contrôle de la croissance et du métabolisme cellulaire, ce mécanisme implique une régulation hormonale précise. Les hormones peuvent agir à long ou à court terme impliquant respectivement des changements au niveau des facteurs de traduction et des ribosomes dans le premier cas et plutôt au niveau de l'activité des composantes traductionnelles dans la seconde option {114}. Bien que plusieurs hormones et facteurs de croissance soient connus pour avoir un effet sur la traduction, les mécanismes par lesquels ils agissent restent encore mal compris. La figure 4 schématise les réactions impliquées dans l'initiation de la traduction et le tableau II résume les fonctions des nombreux facteurs eucaryotiques impliqués dans la traduction {116-118}.

1. Initiation de la traduction (figure 4):

Deux processus importants sont accomplis au cours de l'initiation. Premièrement, un ARNm est sélectionné par le ribosome parmi tous ceux disponibles, pour être traduit. En second lieu, le ribosome identifie le codon initiateur et commence la traduction dans un cadre de lecture approprié. La figure 4 résume bien ces étapes {116}.

L'initiation de la traduction peut se diviser en quatre étapes majeures:

1. La dissociation des ribosomes en deux sous-unités 40S et 60S.
2. La liaison de l'ARNt-méthionyl (ARNt-met) à la sous-unité 40S pour former le complexe de pré-initiation 43S.
3. La liaison de l'ARNm au complexe de pré-initiation 43S pour former le complexe d'initiation 48S.
4. La jonction du complexe d'initiation 48S à la sous-unité 60S pour créer le complexe d'initiation 80S.

Dans la cellule, à des concentrations physiologiques de Mg^{2+} , la forme 80S des ribosomes prédomine dans un équilibre actif avec les sous-unités 40S et 60S dissociées. Les facteurs d'initiation eIF3, eIF3A et eIF1A viennent modifier cet

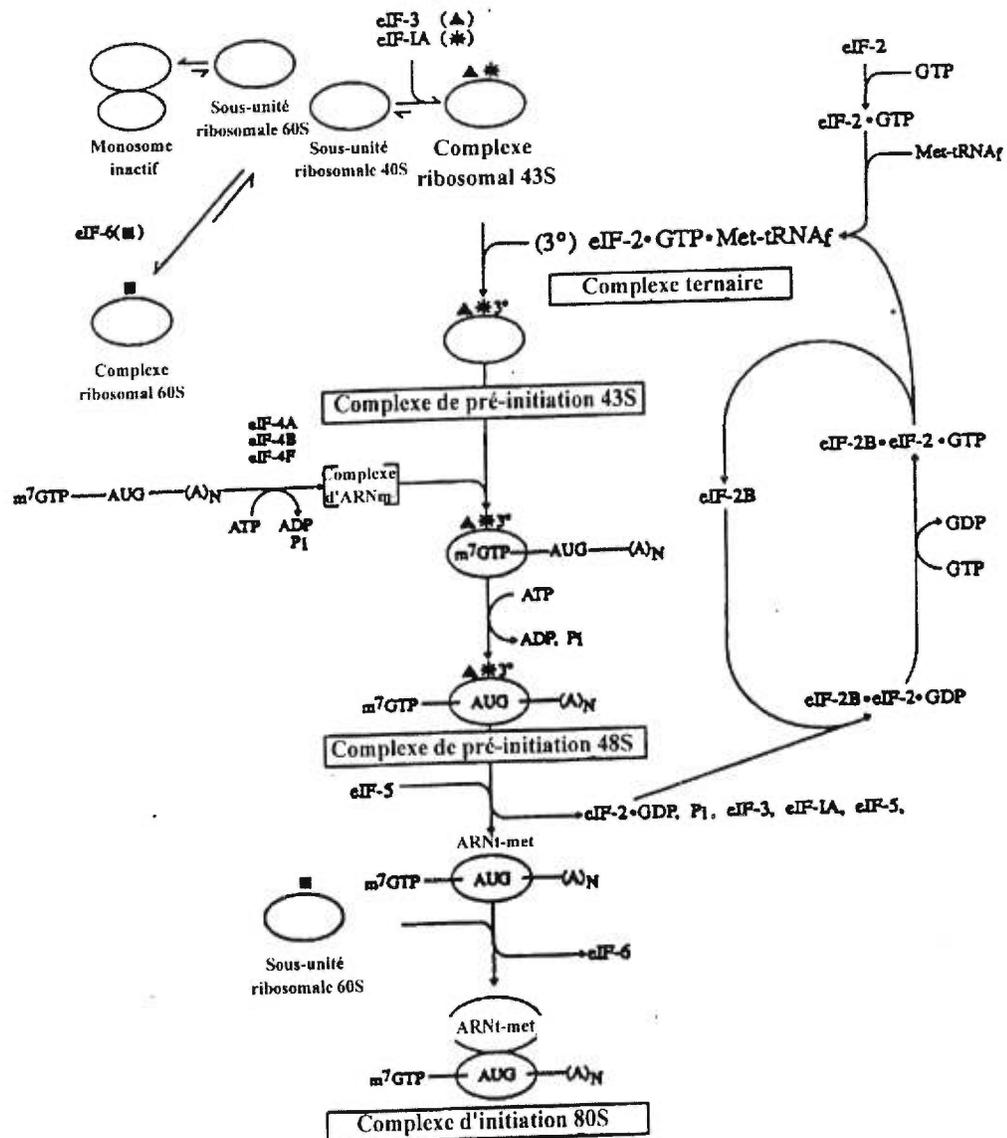


Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

Schéma adapté de Morley et Thomas, 1991 {116}.

Tableau II: Propriétés des facteurs eucaryotiques de la traduction

Nouvelle nomenclature	Ancienne nomenclature	Masse moléculaire (kDa)		Sous-unités	Activité caractéristique	Séq. connue	Autres commentaires
		Native	SDS				
Facteurs d'initiation							
eIF1	eIF-1	15	15		Formation des complexes 43S et 48S	Non	
eIF1A	eIF-4C	17	17		Association du complexe 43S	Oui	Allèles/ isozymes
eIF2	eIF-2	130	36 38 55	α β γ	Liaison GTP-dépendante de l'ARNt-met au complexe 43S	Oui	Site majeur de régulation
eIF2B	eIF-2B GEF	272	26 39 58 67 82	α β γ δ ϵ	Échange GDP/GTP pour eIF2-GDP	Non	
eIF3	eIF-3	550	35 36 40 44 47 66 115 170	α β γ δ ϵ ξ η θ	Dissociation de 80S et formation du complexe 43S	Non	
eIF3A	eIF-6	25	25		Dissociation du ribosome et liaison à 60S	Non	
eIF4A eIF4 β	eIF-4A	45	45		Hélicase d'ARN, ARN-dépendante ATPase et liaison ARNm au 43S	Oui	Fait partie de eIF4F, isozymes
eIF4B	eIF-4B	140	80		Stimule activité de eIF4A et eIF4F et liaison ARNm au 43S	Oui	

Tableau II: Propriétés des facteurs eucaryotiques de la traduction

Nouvelle nomenclature	Ancienne nomenclature	Masse moléculaire (kDa)		Sous-unités	Activité caractéristique	Séq. connue	Autres commentaires
		Native	SDS				
eIF4E eIF4 α	CBP-1	25	25		Liaison à la coiffe de l'ARNm	Oui	Site majeur de régulation
eIF4F	eIF-4F	270	25 44 220	α β γ	Reconnaissance de la coiffe, hélicase d'ARN, ARN-dépendante ATPase, liaison ARNm au 43S	Oui	Site majeur de régulation
eIF4G	eIF-4G	220	220		Protéine d'échaffaudage	Non	
eIF5	eIF-5	60	60		Hydrolyse du lien entre eIF2-GTP		
eIF5A	eIF-4D	15	15		Stimule synthèse du 1 ^{er} lien peptidique	Oui	Isozymes
Facteurs d'élongation							
eEF1 α	EF-1 α	51	51		Liaison GTP-dépendante de l'ARNt-aminoacyl	Oui	Isozymes
eEF1 $\beta\gamma$	EF-1 $\beta\gamma$	30 48	30 48	β γ	Échange GTP/GDP pour eEF-1 α et recycle eEF-1 α	Oui	
eEF-2	EF-2	95	95		Translocation au site P et GTPase ribosome-dépendant	Oui	
Facteur de terminaison							
eRF	RF	110	55		Terminaison	Oui	Reconnait 4 nucléotides

Tableau adapté de Merrick, 1992 {117} et Voorma et coll., 1994 {118}

équilibre en se liant aux sous-unités libres, empêchant ainsi la formation de la forme 80S, et générant une quantité substantielle de sous-unités 40S libres nécessaires pour débiter l'initiation {111,117}.

La liaison de l'ARNt-met à la sous-unité 40S est une étape commune à tous les ARNm. Les facteurs eIF2, eIF3 et eIF1A sont impliqués à ce niveau. eIF2 forme un complexe binaire avec le GTP pour pouvoir se lier à l'ARNt-met et former un complexe ternaire dont la formation est stimulée par eIF3. Ce complexe ira finalement se lier à la sous-unité 40S formant ainsi le complexe de pré-initiation 43S qui est stabilisé par eIF3 et eIF1A. Il est généralement suggéré que ce complexe représente la forme active de la sous-unité ribosomale {111,117}.

La troisième étape est représentée par la liaison de l'ARNm au complexe de pré-initiation 43S et peut se faire selon deux modes. Tout d'abord, selon le modèle par balayage (*scanning model*), le ribosome se lie à l'extrémité 5' de l'ARNm et l'explore de façon linéaire dans le but de trouver le codon initiateur AUG. Tandis que selon le modèle d'initiation interne (*internal initiation*), le ribosome se lie à une région interne de l'ARNm, soit directement au codon AUG ou très près et le cherche. Dans les deux situations, la formation du complexe d'initiation 48S (ARNm/40S/ARNt-met) nécessite l'hydrolyse d'ATP et implique un grand nombre de facteurs d'initiation.

Le modèle par balayage est celui utilisé par la majorité des ARNm cellulaires. Certaines particularités au niveau de l'ARNm sont par contre importantes et nécessaires pour ce modèle. Une des caractéristiques ubiquitaires des ARNm cytoplasmiques des cellules eucaryotiques est la présence en 5' d'un résidu 7-méthyl-guanosine, nommée 5'-coiffe ou structure en coiffe, qui est liée au prochain nucléotide par un groupe 5'-5'triphosphate (m^7GTP) {108,110,114}. La présence et l'accessibilité de cette structure unique en coiffe est la première de ces particularités essentielles pour le modèle par balayage. Cette propriété structurelle facilite la liaison

de l'ARNm au ribosome {111,119}. Les structures secondaire et tertiaire de l'ARNm sont également importantes puisque selon leur stabilité et leur position, elles peuvent favoriser ou non la traduction. L'emplacement du codon initiateur, qui est presque toujours AUG, détermine l'efficacité du balayage du ribosome. Enfin, la présence et la longueur d'une suite d'adénosine en 3' de l'ARNm (nommée queue de poly A en 3') vient augmenter l'efficacité de traduction {111}. Le modèle par balayage représente en fait la traduction dépendante de la coiffe. La liaison de l'ARNm au complexe 43S pour former le complexe d'initiation 48S nécessite de l'ATP et au moins quatre facteurs d'initiation (eIF4A, eIF4E et eIF4G, qui compose le complexe eIF4F, et eIF4B) en plus de eIF3, eIF1A et eIF2 qui sont déjà liés à la sous-unité 40S. La formation du complexe 48S, qui représente l'étape limitante de l'initiation de la traduction, est réglée par différentes conditions physiologiques en étant étroitement reliée au stade de croissance de la cellule {32}. La suite d'événements exacte menant à la formation du complexe 48S n'est pas encore très claire et nécessite plusieurs étapes {108,111}. Le facteur eIF4F se lie tout d'abord à la coiffe via la sous-unité eIF4E qui est l'unique facteur capable de lier la structure 5'm⁷GTP de la coiffe (*cap binding protein*). Par la suite, le facteur 4G (aussi appelé p220), qui est probablement déjà associé avec le complexe 43S via eIF3, vient juxtaposer les facteurs 4A et 4B près de la structure en coiffe. Le facteur eIF4A est une hélicase à ARN dépendante de l'ATP. Les facteurs 4E, 4A et 4G forment un complexe 4F fonctionnel. Le facteur eIF4B vient amplifier la capacité d'hélicase à ARN de 4A, ce qui permet le déroulement de la structure secondaire de l'ARNm créant ainsi une région d'ARN à simple brin qui sert de site de liaison pour le ribosome. Cette réaction nécessite l'hydrolyse d'ATP. La sous-unité ribosomale 43S peut alors effectuer un balayage dans le but de trouver le codon initiateur AUG. En dernier lieu, et ce avec la collaboration des facteurs eIF2 et 4B, l'anti-codon de l'ARNt-met interagit avec le codon AUG générant le complexe 48S mature {32,108,111}.

La reconnaissance du codon initiateur, par la méthode de balayage, peut être favorisée par la présence d'une séquence consensus spécifique facilitant la tâche pour l'ARN de

transfert. L'absence de structure secondaire dans la région non-traduite alors que dans la région codante, cette forme de structure est considérable, obligerait le complexe 43S à ralentir, sinon à s'arrêter dans la région codante facilitant ainsi la reconnaissance du AUG initiateur et à passer rapidement dans la région non-codante {117}.

Pour la quatrième étape, une fois la bonne combinaison faite entre le codon AUG et l'anti-codon de l'ARNt, l'hydrolyse du GTP du complexe d'initiation 48S est réalisée grâce à la participation des facteurs eIF2 et eIF5. Cette hydrolyse occasionne le relâchement des facteurs d'initiation de la surface de la sous-unité 40S, tels que eIF2-GDP, eIF1A et eIF3 et eIF5, ce qui permet la liaison de la sous-unité 60S, qui est également libérée de eIF3A, pour former le complexe 80S. La liaison entre les sous-unités 40S et 60S doit se faire rapidement puisque la stabilité du lien entre l'ARNt-met et 40S est faible en absence de eIF2. Le complexe binaire eIF2-GDP doit échanger le GDP pour du GTP dans le but de poursuivre la catalyse de réactions subséquentes. Le taux d'échange étant lent, cette réaction est catalysée par eIF2B qui favorise donc le recyclage de eIF2 {111,114,117}. L'hydrolyse du GTP se fait plus rapidement en présence de la sous-unité 60S, ce qui laisse croire que ces sous-unités ribosomales (40S et 60S) sont probablement reliées {117}.

Le mécanisme d'initiation interne, qui représente le deuxième mécanisme d'initiation, apporte une contribution mineure dans la traduction des cellules de mammifères. Il peut jouer un rôle en permettant la traduction d'une petite classe d'ARNm lorsque la traduction coiffe-dépendante n'est pas possible. Les ARNm possédant de longues régions 5'non-traduites qui contiennent de nombreux codons AUG sont de bons candidats pour ce type de traduction. Les mécanismes et les facteurs impliqués dans ce processus ne sont pas encore bien connus {111}.

2. Élongation de la traduction (figure 5):

A la suite de la formation du complexe d'initiation 80S, débute la phase d'élongation. Le premier lien peptidique réalisé possède une caractéristique unique qui le distingue

des autres liens peptidiques. L'ARNt-met situé dans le site P (site peptidyl ou donneur) du ribosome a un groupe α -aminé chargé alors que dans les liens suivants, l'ARNt-aminoacyl sera acétylé comme un ARNt-peptidyl {111}. Le facteur d'initiation eIF5A semble promouvoir la formation de cette première liaison peptidique.

La phase d'élongation est un processus cyclique qui ajoute un acide aminé à la région C-terminal du polypeptide naissant à chaque cycle et peut être divisé en quatre étapes majeures qui sont illustrées à la figure 5 {116}. La première étape consiste en la liaison de l'ARNt-aminoacyl approprié au niveau du site A du ribosome (site accepteur), adjacent au site P, et est catalysée par le facteur d'élongation eEF-1 α . La seconde étape se résume à l'hydrolyse du GTP en GDP et le relargage du complexe binaire eEF-1 α -GDP. Lorsque les sites P et A sont occupés, la formation du lien peptidique peut avoir lieu et cette réaction est catalysée par l'enzyme peptidyl transferase, ce qui constitue la troisième étape. Finalement, une translocation catalysée par eEF2 et le GTP, permet à un autre ARNt-aminoacyl de venir occuper le site A et entamer le prochain cycle d'élongation.

Chaque cycle nécessite énormément d'énergie, puisque la majorité de l'énergie requise pour la synthèse de protéines est utilisée au niveau du processus d'élongation {111,117}

3. Terminaison de la traduction:

La phase de terminaison de la traduction est très simple. La chaîne peptidique est complétée lorsqu'un des trois codons d'arrêt (UAA, UGA et UAG) se positionne au niveau du site A du ribosome et est reconnu, grâce au lien GTP, par le facteur de relâchement (RF). Ce dernier induit une hydrolyse du lien aminoacyl et du GTP, occasionnant le relargage du complexe RF-GDP et du peptide complété. L'action du RF est nécessaire pour une terminaison efficace et permet le recyclage des ribosomes et de l'ARNm pour amorcer un autre cycle de traduction {111,117}.

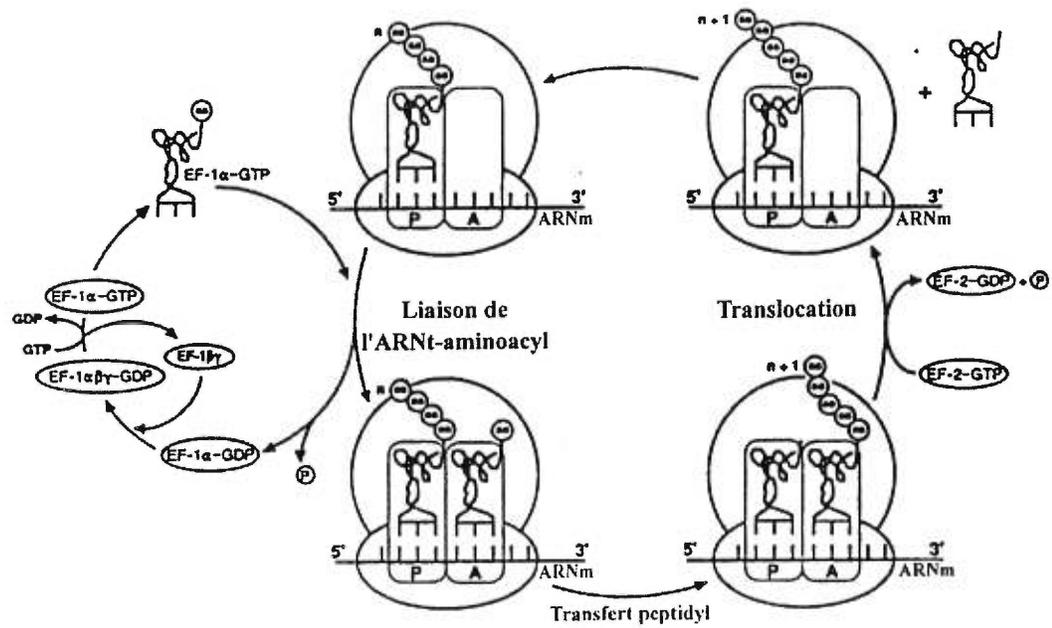


Figure 5: Représentation schématique du cycle d'élongation de la synthèse de protéines chez les eucaryotes.

Schéma adapté de Morley et Thomas, 1991 {116}.

III. Régulation de la traduction:

La modification covalente des protéines par phosphorylation est un des moyens le plus commun pour contrôler rapidement un processus métabolique cellulaire. Dans de nombreux exemples de contrôle traductionnel, tels que la fertilisation, la mitose et le traitement des cellules par des hormones, facteurs de croissance ou mitogènes, le taux de synthèse de protéines est modifié en quelques minutes et est facilement inversé, suggérant que les mécanismes de régulation impliquent des changements dans l'activité spécifiques des protéines plutôt que dans leur expression respective {110}. Le mécanisme de contrôle dominant de la synthèse de protéines est la phosphorylation/déphosphorylation des composantes de la machinerie traductionnelle et, en premier lieu, des facteurs d'initiation et d'élongation {111}. Le grand nombre de facteurs d'initiation impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire indique que les mécanismes par lesquels le taux de traduction module la croissance et la prolifération cellulaire sont très complexes et intégrés {32}.

1. Étapes limitantes de la traduction:

Le contrôle majeur de la traduction se fait au niveau de l'étape de l'initiation, qui représente donc l'étape limitante, dans des conditions physiologiques {32,110,111}. Dans le but de changer le taux de synthèse de protéines, la cellule doit altérer cette étape {111}. Au niveau de l'initiation de la traduction, la régulation se fait à l'étape de la liaison de l'ARNm au complexe de pré-initiation 43S {108,109}. Le niveau d'ARNm disponible pour la liaison est déterminé par l'efficacité de la transcription, c'est-à-dire, le taux de synthèse de l'ARN, l'efficacité du processus post-transcriptionnel, ainsi que du transport de l'ARN hors du noyau {111}. Le facteur limitant n'est pas l'ARNm mais plutôt les composantes de la machinerie traductionnelle. Il y a donc compétition entre les ARNm pour la liaison à la sous-unité 40S du ribosome {110}. Le nombre de ribosomes disponibles semble définir la capacité totale d'une cellule pour effectuer la synthèse protéique. Les tissus relativement actifs au niveau de la synthèse de protéines, tels que le foie et le cerveau,

contiennent une grande quantité de ribosomes et de facteurs d'initiation {111}.

La liaison de l'ARNm au complexe de pré-initiation 43S est catalysée par plusieurs facteurs d'initiation, dont eIF2 et les facteurs du complexe eIF4F qui sont donc des candidats potentiels de régulation de la synthèse protéique par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation {111}. Par contre, même si les protéines se liant à l'ARNm sont en bonne position pour exercer un contrôle sélectif sur la traduction de différents ARNm, elles ne sont pas les seules puisque les facteurs d'élongation (eEF-2) et la protéine ribosomale S6 sont également des cibles pour l'action des stimuli extracellulaires et peuvent donc jouer un rôle dans le contrôle traductionnel {114}.

2. Facteurs d'initiation de la traduction impliqués dans la régulation hormonale de la traduction:

2.1. eIF2:

Le contrôle de l'activité du facteur d'initiation eIF2 demeure de loin le mieux compris. Ce facteur, qui est un hétérotrimère (sous-unité α , β et γ), module la liaison de l'ARNt-met au ribosome d'une façon dépendante du GTP. Lorsqu'il est lié au GDP (à l'état non-stimulé), eIF2 ne peut lier l'ARNt-met et il doit donc échanger le GDP pour le GTP. La vitesse de cet échange est faible et requiert l'aide du facteur d'échange eIF2B dans des conditions physiologiques pour remplacer GDP par GTP et permettre le recyclage d'eIF2 et par conséquent le début d'un autre cycle de traduction {114}. La phosphorylation de la sous-unité α dans le complexe eIF2-GDP favorise une liaison plus solide à eIF2B. Étant ainsi séquestré, eIF2B ne peut catalyser l'échange de GTP pour le GDP, ce qui inhibe la synthèse de protéines et empêche le recyclage de eIF2 {111,114,117}. La phosphorylation de eIF2 α est donc un mécanisme général d'inhibition de l'initiation de la traduction {111}.

2.2. eIF4F:

La vitesse d'initiation de la traduction peut être déterminée par la concentration

cellulaire des sous-unités du facteur d'initiation eucaryotique 4F et plus spécialement par eIF4E, qui est la sous-unité limitante {121}. De nombreuses observations suggèrent que le processus de liaison à la structure en coiffe de l'ARNm, et plus particulièrement l'activité du facteur d'initiation eIF4E, peuvent constituer la clé d'une étape régulatoire importante dans la traduction de l'ARNm {114}. Tout d'abord, les protéines liant la coiffe en 5' sont les premières à se lier à l'ARNm, impliquant que les liaisons subséquentes sont dépendantes de l'interaction de ces protéines et de l'ARNm. En second lieu, eIF4E est le facteur d'initiation le moins abondant dans la cellule. Il est présent en quantité limitée et est significativement plus rare que l'ARNm, occasionnant ainsi une compétition entre les ARNm pour la liaison d'eIF4E {114}. Une des composantes très importante impliquée dans l'étape limitante de l'initiation de la traduction est le complexe eIF4F qui est formé de trois sous-unités tel que mentionné auparavant. La phosphorylation du complexe eIF4F stimule la synthèse de protéines {117}. Le facteur eIF4A qui possède une activité d'hélicase d'ARN dépendante de l'ATP, ne peut se lier à la structure en coiffe de l'ARNm seulement qu'en présence de eIF4G et ne semble pas être contrôlé par phosphorylation. Le facteur eIF4G tient le rôle de protéine d'échaffaudage pour assembler le complexe protéique qui compose la machinerie dirigeant le ribosome vers l'ARNm {32}. Elle est en mesure de s'attacher à la structure m⁷GTP en 5' de l'ARNm uniquement en présence de eIF4E {121} et peut subir une phosphorylation par, entre autre, la protéine kinase C {111}.

2.3. eIF4E:

2.3.1. Caractéristiques:

Le facteur d'initiation eIF4E peut être isolé chez les mammifères à partir d'une préparation riche en ribosomes {110}. La séquence primaire d'eIF4E a été déterminée chez un bon nombre d'espèces dont l'humain {105}, la souris {122}, le lapin {123}, la levure {12} et le blé {124}. Le facteur eIF4E humain possède une séquence de 217 résidus avec un poids moléculaire de 25 117 Daltons. Une particularité remarquable dans la séquence en acides aminés de eIF4E est la richesse en résidus tryptophane,

dont huit sont conservés parmi les différentes espèces {105}. Ces derniers acides aminés sont localisés au niveau central de la séquence d'eIF4E qui est plus stable que les régions C- et N-terminal. Le fait que les régions hautement conservées entre les différentes espèces soient localisées centralement suggère que le noyau central de la séquence d'eIF4E serait responsable des fonctions de ce facteur d'initiation, telle que la liaison à l'ARNm et au ribosome, mais n'est pas nécessairement impliqué dans la régulation de l'activité {110}.

2.3.2. Rôle de eIF4E dans la cellule:

L'importance de la traduction, et par conséquent des facteurs d'initiation, est démontrée par le fait que les métabolismes vitaux pour la cellule ainsi que les processus de développement précoce sont contrôlés au niveau traductionnel. Bien que le noyau soit un point important d'attention pour étudier la régulation de l'expression des gènes, plusieurs voies de régulation sont exécutées au niveau du cytoplasme. La traduction, la stabilité ou encore la localisation de l'ARNm mature peuvent être soumis à une régulation cytoplasmique {125}.

Le facteur eIF4E se distingue des autres polypeptides composant le complexe eIF4F puisque cette protéine est la seule composante de la machinerie traductionnelle à pouvoir se lier, de façon totalement indépendante des autres protéines ou encore de l'ATP, à la structure en coiffe m⁷GTP de l'ARN messenger et ce, quelle que soit la structure de l'ARNm, *in vivo* et *in vitro* {126-131}. Cette caractéristique en fait une composante très importante dans le contrôle de la traduction {132}. La séquence WEDE, c'est-à-dire, tryptophane, glutamate, aspartate et glutamate (acides aminés 102 à 105 chez l'humain) est responsable de la liaison d'eIF4E à la coiffe de l'ARNm et le résidu tryptophane serait le plus important {121}. Par contre, le complexe eIF4F se lie plus efficacement à la coiffe de l'ARNm que eIF4E seul, ce qui démontre bien l'importance de tous les éléments pour une liaison solide et stable de l'ARNm au ribosome {121}.

De plus, eIF4E est retrouvé en quantité très peu abondante dans la cellule {133} et il

existe une excellente corrélation entre le degré de phosphorylation de ce facteur et le taux de traduction *in vivo*, ce qui en fait un excellent candidat dans la régulation de la traduction et de la croissance cellulaire {32}. En fait, eIF4E est essentiel pour la synthèse de protéines selon le mode de traduction dépendante de la coiffe et la viabilité des cellules puisque, la diminution du taux d'eIF4E présent dans les cellules ralentit la vitesse de croissance et entraîne la mort cellulaire {32,134}.

Le facteur eIF4E ne catalyse pas la formation ou la rupture de liens peptidiques et n'a donc aucune activité enzymatique. Par contre, il possède un bon nombre d'activités biochimiques et biologiques telles que, la capacité de se lier à l'ARNm et aux facteurs eIF4A et 4G, l'habilité d'induire l'entrée de cellules quiescentes en phase S du cycle cellulaire et, chez certain type cellulaire, la capacité de causer la perte du contrôle de la croissance {110}.

2.3.3. Régulation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E:

Etant donné le rôle important d'eIF4E dans le contrôle de la machinerie traductionnelle, il n'est pas étonnant que ce facteur soit soumis à une régulation selon plusieurs mécanismes. L'activité de eIF4E peut donc être réglée à trois niveaux : tout d'abord par sa caractéristique de facteur limitant de la machinerie traductionnelle, deuxièmement, par sa phosphorylation qui module son activité et, en dernier lieu, par la liaison de deux protéines régulatrices (4E-BP1 et 4E-BP2) qui empêchent sa liaison à l'ARNm {32,135,136}.

2.3.3.1. Phosphorylation:

La liaison de l'ARNm au ribosome se produit seulement lorsque le facteur eIF4E est phosphorylé, puisque son association avec la structure en coiffe n'est possible que sous cette forme {32,134}. Une diminution de la phosphorylation de eIF4E provoque une perte des fonctions du complexe eIF4F et une inhibition de la traduction. Cela a été observé après un choc thermique, au cours la mitose ou encore après une infection. A l'opposé, une augmentation de la phosphorylation du facteur 4E stimule la traduction et la synthèse de protéines en accélérant le taux de liaison de l'ARNm au

ribosome {110,134}. Le mécanisme par lequel la phosphorylation de eIF4E influence son activité biologique n'est pas encore bien compris, par contre il est démontré que le facteur 4E phosphorylé a une plus grande affinité et facilité d'assemblage avec l'ARNm et les autres facteurs d'initiation tels eIF4G et eIF4F {135,137}. Lorsqu'il est intégré au facteur 4F, eIF4E est alors un meilleur substrat et cette phosphorylation vient stimuler la synthèse de protéines {114}.

Le facteur eIF4E est phosphorylé en réponse au traitement des cellules par de nombreux facteurs de croissance, hormones et agents mitogènes {32,132}. La phosphorylation du facteur par une si grande variété de signaux de croissance est en accord avec le fait que eIF4E joue un rôle important dans la réponse hypertrophique qui est associée à un accroissement de l'efficacité de traduction {32}.

La sérine 53 avait d'abord été identifiée comme le site majeur de phosphorylation de eIF4E par Rychlik et coll. {138}, mais des études plus récentes ont démontré que la sérine 209, située près du C-terminal, était le site majeur de phosphorylation de eIF4E {32,139} et que la thréonine 210 peut également être phosphorylée {140}. Cette réassignation du site majeur de phosphorylation n'enlève pas à la sérine 53 son importance au niveau de l'activité de eIF4E, puisque cette position semble être importante pour la fonction propre de la protéine {139}. La phosphorylation de eIF4E sur la sérine 209 est par contre nécessaire pour son activité {110,121,124,141,142}. La régulation de la phosphorylation d'eIF4E peut impliquer la modulation de protéines kinases et de protéines phosphatases {32}.

La protéine kinase responsable de la phosphorylation de eIF4E n'a pas encore été clairement identifiée mais des études récentes suggèrent quelques candidats potentiels. Cette phosphorylation pourrait être le fruit de l'action de plusieurs kinases selon le type de cellules ou de l'agoniste. Les PKC ont été parmi les premiers candidats identifiés mais depuis, plusieurs autres se sont ajoutés à la liste, dont la protamine kinase stimulée par l'insuline (cpk) {140}, les MAP kinases {135} et, tout récemment, MNK1 (*MAP kinases interacting kinase 1*) {69}. Les esters de phorbol qui activent

certaines isoformes de la PKC ou encore une stimulation par l'AII {143} induisent une phosphorylation de eIF4E sur la sérine 209 de façon PKC-dépendante {32}. Par contre, en réponse à une stimulation par l'insuline ou encore par du sérum, les PKC ne semblent avoir aucun effet sur eIF4E {144}. La phosphorylation de eIF4E induite par l'insuline n'est pas bloquée par la rapamycine, qui est un inhibiteur spécifique de la $p70^{S6k}$, mais est sensible à la wortmannine qui inhibe la PI3K et bloque l'activation des MAP kinases dans certaines cellules {135}. Le PD 98059, un inhibiteur de MEK, donc par conséquent de l'activation de ERKs, bloque la phosphorylation de eIF4E en réponse à l'insuline, ce qui suggère que les MAP kinases pourraient moduler l'effet de phosphorylation de eIF4E suite à la stimulation par l'insuline {135}.

Plusieurs évidences suggèrent que MNK1 serait également un candidat pour la phosphorylation de eIF4E *in vivo*. Cette protéine kinase est activée par les agonistes qui stimulent les cascades ERK ou encore $p38^{MAPK}$, mais ne semblent pas interagir dans la troisième cascade de MAP kinases, c'est-à-dire, JNK {69}. De récentes études ont montré tout d'abord que la sérine 209 est phosphorylée par MNK1 suite à la stimulation des cellules par l'insuline et que cette phosphorylation demande la participation de ERK {145}. De plus, l'activation de la protéine Ras, qui se trouve en amont de la cascade MAP kinase et donc de MNK1, mène à la phosphorylation de eIF4E {146}, alors que la phosphorylation induite dans les cellules traitées avec le NGF est bloquée par l'action d'un mutant dominant négatif de la protéine Ras {147}.

2.3.3.2. Protéines se liant au facteur d'initiation de la traduction 4E:

La troisième voie de régulation de l'activité de eIF4E est caractérisée par la liaison de deux phosphoprotéines nommées 4E-BP1 et 4E-BP2 (pour *4E binding protein 1* et *2*). La liaison d'une de ces protéines au facteur 4E entraîne l'inhibition de la traduction coiffe-dépendante seulement {64,125}, empêchant l'action de eIF4E {135}. Il existe entre eIF4E et eIF4G une interaction spécifique et directe qui est nécessaire au déroulement de la traduction. La région impliquée dans cette interaction contient un motif de séquence conservé qui est également retrouvé chez BP1 et BP2, ce qui suggère que eIF4G et 4E-BPs compétitionnent pour le site d'interaction au facteur 4E

{119,132,148}. Par conséquent l'assemblage du complexe eIF4F ne peut s'effectuer correctement et l'initiation de la traduction ne peut avoir lieu {98,119,125,149}. Les détails de cette interaction seront décrits dans la section 4.

L'interaction de BP1 et BP2 avec eIF4E est négativement réglée par phosphorylation en réponse au traitement des cellules par des facteurs de croissance, hormones et mitogènes {98,119}. Ainsi, lorsque 4E-BP1 est phosphorylée en réponse à l'insuline ou à l'AII par exemple, l'affinité de la protéine pour eIF4E est diminuée et il y a dissociation du complexe eIF4E/4E-BP1 {119,136,150,151} permettant ainsi de procéder à l'initiation de la traduction. Toutefois, la phosphorylation du facteur eIF4E n'empêche pas sa liaison à 4E-BP1 et cette phosphorylation ne provoque pas directement le relargage de 4E-BP1 {135}.

Par ailleurs, en présence de 4E-BP1 et BP2, la phosphorylation de eIF4E par la PKC est fortement diminuée, ce qui suggère un modèle en deux étapes pour la phosphorylation de eIF4E en réponse aux facteurs de croissance et hormones. Tout d'abord la dissociation du complexe 4E-BP1/eIF4E via la phosphorylation de BP1 et en second lieu la phosphorylation de eIF4E {136}. Lorsque le facteur 4E est complexé à 4E-BP1 ou à 4E-BP2, il ne représente plus un substrat pour la PKC et il est donc possible que la dissociation de BP1 ou BP2 soit un pré-requis pour l'activation de eIF4E par phosphorylation {136}. Les caractéristiques et la régulation du facteur répresseur de la traduction 4E-BP1 feront l'objet de la prochaine section.

2.3.4. Surexpression et sous-expression du facteur d'initiation eIF4E:

Il est possible d'émettre l'hypothèse que l'activation anormale de la traduction pourrait représenter une voie commune pour la transformation néoplasique {152}. La transcription de eIF4E est réglée par *c-myc*, ce qui implique que la quantité de 4E est contrôlée en respectant la capacité de prolifération des cellules {153}. La corrélation entre la régulation d'eIF4E et de la croissance cellulaire est à l'origine de résultats indiquant que la dérégulation de l'activité du facteur eIF4E entraîne une

transformation maligne des cellules qui corrèle bien avec l'idée que cette composante traductionnelle est un important transmetteur de signaux cellulaires {32,154,155}. La surexpression du facteur eIF4E semble activer de multiples voies parallèles, engendre des changements dramatiques dans le contrôle de la croissance cellulaire {32} et entraîne une transformation des cellules qui deviennent alors tumorales {111,121,153,154}.

L'induction de l'expression du facteur eIF4E dans les cellules normales demande une stimulation par du sérum ou par des facteurs de croissance alors que dans les cellules tumorales ou transformées, cette stimulation n'est pas nécessaire {152}. La perte de contrôle de la croissance après la surexpression de eIF4E pourrait être attribuable à une augmentation du taux de protéine ou du niveau de phosphorylation {110}. L'augmentation incontrôlée de la synthèse de protéines dans une cellule affectée par un oncogène peut imposer une pression sélective à la cellule dans le but de se répliquer plus rapidement causant par conséquent la perte du contrôle négatif de la croissance cellulaire. Une accumulation constante de protéines associée à une réplication cellulaire insuffisante induit un déséquilibre et, éventuellement, la mort cellulaire {152}. Selon Sonenberg {154}, le facteur 4E est un membre d'une nouvelle classe d'oncogènes cytoplasmiques associée à la synthèse de protéines, différentes des classes d'oncogènes associées à la membrane ou au noyau {110}.

La régulation du cycle cellulaire est majoritairement orchestrée par les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (*cyclin-dependent kinases* ou CDK). Un fait intéressant est que la surexpression de eIF4E élève le taux de cycline D1, cette dernière étant impliquée dans la transition G1-S du cycle cellulaire. Ceci peut suggérer qu'en plus de l'augmentation du taux global de synthèse de protéines, la surexpression de eIF4E entraînerait une augmentation sélective de la traduction d'ARNm de gènes stimulant la croissance tels que la cycline D1 {156}, l'ornithine décarboxylase {157} et *c-myc* {158}. L'augmentation du taux de cycline D1 dans les cellules surexprimant eIF4E pourrait jouer un rôle dans les événements complexes qui mènent à la transformation cellulaire {156}.

2.4. Autres protéines impliquées dans la régulation de la traduction:

La phosphorylation de la protéine S6 ribosomale est une autre voie de régulation de la traduction puisque cette protéine est une composante de la sous-unité 40S du ribosome qui peut être impliquée dans la liaison avec l'ARNm. L'exposition de différents types cellulaires à des facteurs de croissance, hormones et agents mitogéniques résulte en une augmentation substantielle de la phosphorylation de la protéine S6 sur au moins cinq résidus sérine près de l'extrémité C-terminale. Bien qu'il y ait une corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation de la protéine S6 et la stimulation de la synthèse de protéines, il est difficile de prouver et d'expliquer comment cette phosphorylation peut influencer la traduction {64,108,111,114}. La protéine kinase responsable de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 *in vivo* est la p70^{S6k}.

La stimulation simultanée de la phosphorylation des facteurs d'initiation 4F, 4B, 3 et de la protéine ribosomale S6 par les esters de phorbol ou des facteurs de croissance suggère qu'il y a une régulation coordonnée et complexe des composantes traductionnelles. Le facteur 4F et plus spécialement 4E, semblent être des cibles particulièrement importantes dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la traduction. Il reste tout de même à établir si la phosphorylation d'autres protéines est aussi importante {111}.

C. Les protéines régulatrices 4E-BP1 et 4E-BP2:

I. Caractéristiques:

Des études récentes ont permis l'isolation et la caractérisation d'un nouveau répresseur de la traduction dépendante de la structure en coiffe de l'ARN messager. Cette protéine est nommée 4E-BP1 pour *eIF4E binding protein* pour l'homologue humain et PHAS-I (*phosphorylated heat and acid stable protein regulated by insulin*) chez le rat {32,159,160}. Deux séquences différentes, mais tout de même apparentées, ont été clonées à partir d'une librairie d'ADN complémentaire (ADNc)

a

4E-BP1	MSGSSCSQT	I	SRAI	P	T	R	V	L	C	L	E	V	Q	L	P	G	D	Y	S	T	T	P	G	48																			
4E-BP2	MSSSACSGHQ	F	G	S	R	A	I	P	T	R	V	A	I	S	C	A	Q	L	P	H	D	Y	S	T	48																		
Consensus	MS.....	F	S	R	A	I	P	T	R	V	..	C	..	Q	L	P	..	D	Y	S	T	T	P	G	50																		
4E-BP1	GTRIIYDRKF	L	M	E	C	R	N	S	P	V	T	M	T	P	P	R	L	P	H	I	P	G	V	T	S	P	S	--	D	E	P	P	M	E	A	S	Q	S	96				
4E-BP2	GTRIIYDRKF	L	L	D	F	R	N	S	P	M	A	C	T	P	P	C	H	L	P	N	I	P	G	V	T	S	P	T	L	I	E	D	S	K	V	E	V	N	N	L	98		
Consensus	GTRIIYDRKF	L	..	R	N	S	P	T	P	P	..	L	P	..	H	..	I	..	P	G	V	T	S	P	100
4E-BP1	HLRNSPEIKR	A	C	G	E	S	Q	F	E	M	D	I	118																														
4E-BP2	NNLNHDKRH	A	C	O	D	A	Q	F	E	M	D	I	120																														
Consensus	...N...K	A	C	..	Q	F	E	M	D	I	122																																

b

4E-BP1	MSGSSCSQT	P	S	R	A	I	P	T	R	R	V	L	G	D	G	V	Q	L	P	P	G	D	Y	S	T	T	P	G	G	T	L	F	S	T	T	P	G	G	T	50	
PHAS-I	MSGSSCSQT	P	S	R	A	I	P	T	R	R	V	L	G	D	G	V	Q	L	P	P	G	D	Y	S	T	T	P	G	G	T	L	F	S	T	T	P	G	G	T	49	
Consensus	MSGSSCSQT	P	S	R	A	I	P	T	R	R	V	..	L	G	D	G	V	Q	L	P	P	G	D	Y	S	T	T	P	G	G	T	L	F	S	T	T	P	G	G	T	50
4E-BP1	RRIYDRKFLM	E	C	R	N	S	P	V	K	T	P	P	D	L	P	T	I	P	G	V	T	S	P	S	D	E	P	P	M	A	S	Q	S	H	L	R	N	100			
PHAS-I	RRIYDRKFLM	E	C	R	N	S	P	V	K	T	P	P	D	L	P	T	I	P	G	V	T	S	P	S	D	E	P	P	M	A	S	Q	S	H	L	H	S	99			
Consensus	RRIYDRKFLM	E	C	R	N	S	P	V	..	K	T	P	P	..	D	L	P	T	I	P	G	V	T	S	P	..	S	D	E	P	P	M	..	A	S	Q	S	H	L	..	100
4E-BP1	SPEDKRAGGE	E	S	Q	F	E	M	D	I	118																															
PHAS-I	SPEDKRAGGE	E	S	Q	F	E	M	D	I	117																															
Consensus	SPEDKRAGGE	E	S	Q	F	E	M	D	I	118																															

Figure 6: Séquences en acides aminés et alignements prédit

a) entre 4E-BP1 et 4E-BP2

b) entre 4E-BP1 et PHAS-I

Figure tirée de Pause et coll., 1994 {159}

de placenta humain et correspondent aux protéines 4E-BP1 et 4E-BP2. Ces deux protéines montrent une homologie de séquence de 56% comme l'indique la figure 6 {159}. Les ADNc de 4E-BP1 et 4E-BP2 codent respectivement pour des protéines de 118 et 120 acides aminés. Les analyses Northern démontrent, par contre, que les ARNm correspondant à ces protéines sont quelque peu différents en longueur puisque l'ARNm de 4E-BP1 est constitué d'environ 850 nucléotides alors que l'ARNm de 4E-BP2 est d'environ 2800 nucléotides {159}. Le poids moléculaire estimé de 4E-BP1 de 22000 Da {160}. La protéine 4E-BP1 sera plus souvent citée que 4E-BP2 dans ce texte, étant donné qu'elle fait l'objet des études qui constituent l'essentiel du manuscrit présenté.

Les séquences des protéines humaine 4E-BP1 et de rat PHAS-I démontrent un degré élevé d'homologie de l'ordre de 93%, ce qui indique que 4E-BP1 est l'homologue humain de la protéine PHAS-I de rat. PHAS-I possède des caractéristiques peu habituelles d'une protéine puisqu'elle est toujours soluble, donc stable, après un traitement à l'acide trichloroacétique 2% ou encore après ébullition {132,159,161}. Initialement identifiée comme étant une protéine phosphorylée en réponse à l'insuline dans les tissus adipeux de rat et dans les cellules adipocytes 3T3-L1, elle est aussi phosphorylée au niveau des résidus sérine/thréonine en réponse aux facteurs de croissance et esters de phorbol {159,162}. PHAS-I est caractérisée par une séquence riche en sérine et thréonine (23%) {162}.

Des analyses d'immunobuvardage par far-western et de coimmunoprécipitation ont confirmé que, tout comme PHAS-I, 4E-BP1 interagit avec eIF4E {159}. Cette interaction entre eIF4E et 4E-BP1 résulte en une inhibition de la traduction coiffée-dépendante aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo* {159}. La phosphorylation de 4E-BP1, en réponse au traitement des cellules par des facteurs de croissance et hormones, diminue son affinité pour eIF4E et empêche l'inhibition de la traduction, tel que mentionné précédemment.

II. Rôle dans l'initiation de la traduction:

La régulation de l'activité de liaison à la coiffe de l'ARNm est essentielle pour une croissance et une prolifération normale de cellules de mammifères {163,164}. Cette régulation est accomplie de différentes façons telles que par la phosphorylation de eIF4E et de eIF4G ainsi que par la phosphorylation de la protéine inhibant l'interaction nécessaire entre les facteurs 4E et 4G, cette protéine étant 4E-BP1 {121}. La liaison entre eIF4E et 4G est très importante pour le recrutement de l'ARNm vers le ribosome auquel eIF4G est associé {165}. Un motif de 12 acides aminés hautement conservé au niveau du facteur eIF4G de mammifère et de levure serait le site crucial permettant l'interaction avec eIF4E {119}. Par ailleurs, la même séquence de 12 résidus est retrouvée au niveau des protéines 4E-BPs et lorsqu'une mutation ponctuelle est effectuée à l'intérieur de ce motif, la liaison avec eIF4E est abolie {119}.

Les protéines 4E-BP1 et 4E-BP2 sont retrouvées sous les formes déphosphorylée, phosphorylée et hyper-phosphorylée. La forme déphosphorylée de la protéine, retrouvée en quantité significative dans les cellules au repos, possède une grande affinité pour eIF4E et s'y lie directement inhibant ainsi la traduction {98}, tandis qu'à l'opposé, la forme hyperphosphorylée n'interagit pas du tout avec le facteur 4E {136}. Ainsi, dans des cellules au repos, tout semble indiquer qu'il y aurait compétition entre eIF4G et 4E-BP1 déphosphorylée {132,159} pour le site de liaison au facteur eIF4E {32}. La protéine 4E-BP1 inhibe donc, de façon réversible, l'initiation de la traduction en interférant avec la formation du complexe eIF4F fonctionnel {88,125,149}. La phosphorylation de 4E-BP1, suite à la stimulation des cellules par des facteurs de croissance ou hormones tels que l'insuline et l'AII, vient rompre la liaison avec eIF4E permettant ainsi à eIF4G de s'y lier et de former un complexe 4F opérationnel pour initier la traduction {159,160}. La traduction indépendante de la structure en coiffe de l'ARNm, utilisée par la cellule dans le cas d'ARNm particuliers, n'est pas affectée par la présence de 4E-BP1 et BP2, phosphorylées ou non {132}.

III. La régulation de 4E-BP1:

La régulation de l'activité de 4E-BP1/PHAS-I s'effectue, comme pour de nombreuses composantes cellulaires, par phosphorylation/déphosphorylation {166}. La majorité des études effectuées pour comprendre la régulation de l'activité de 4E-BP1/PHAS-I ont été réalisées dans les cellules traitées par l'insuline. Certaines équipes ont d'abord rapporté que l'insuline augmentait le taux de synthèse de PHAS-I, la durée de sa demi-vie et évidemment sa phosphorylation. Sur un gel de protéine SDS-PAGE, il est possible d'observer pour la protéine 4E-BP1, trois bandes possédant une vitesse de migration différentes, qui correspondent, dans l'ordre croissant de poids moléculaire, à la forme non-phosphorylée (α), phosphorylée (β) et hyper-phosphorylée (γ) {32}. Il a été initialement rapporté que la stimulation des cellules avec l'insuline induit la phosphorylation de 4E-BP1 majoritairement sur la sérine 64 située trois acides aminés en aval du site de liaison à eIF4E {119,159}.

La phosphorylation de 4E-BP1, en réponse à l'insuline, sur la sérine 64 a d'abord été rapportée comme étant induite par les MAP kinases. Lawrence et coll. {160} ont montré que PHAS-I était rapidement et stœchiométriquement phosphorylée *in vitro* par ERK2 et que la majorité du phosphate introduit par cette protéine kinase *in vivo* en réponse à l'insuline, se retrouvait au site majeur de phosphorylation identifié comme la sérine 64 *in vitro* {162}. Les études cinétiques ont montré que PHAS-I était un excellent substrat de la MAP kinase comparable à la MBP (*myelin basic protein*) qui est le substrat classique pour ERK1 et ERK2 {162}. Le lien suggéré entre la voie des MAP kinases et la régulation de l'étape limitante de la traduction constituait une hypothèse plausible mais surtout attrayante pour expliquer la régulation de la synthèse de protéines par l'insuline et autres facteurs de croissance, ainsi que pour rationaliser certains rôles biologiques des MAP kinases {64}. PHAS-I/4E-BP1 s'avérait un important modulateur de la stimulation de la synthèse de protéines par les divers agents et stimuli qui activent les MAP kinases {160}.

Suite à ces résultats intéressants, nous avons décidé d'étudier les effets de l'angiotensine II sur la phosphorylation de 4E-BP1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat. Dès les premières expériences, nous avons observé que la cinétique d'activation de 4E-BP1 semblait plus lente que celle des MAP kinases et ne correspondait pas aussi étroitement qu'il avait été suggéré {167}. Des études plus approfondies sur ce sujet ont été réalisées, ce qui représente le coeur de ce mémoire. Au même moment, d'autres groupes s'interrogeaient également sur le rôle majeur qui avait été attribué aux MAP kinases dans la phosphorylation de PHAS-I induite par l'insuline. Il s'est avéré que PHAS-I/4E-BP1 est phosphorylé, *in vivo* sur plusieurs résidus plutôt que seulement sur la sérine 64 comme cela avait été initialement avancé, impliquant donc possiblement l'action de différentes protéines kinases {168}. En plus de contenir sept sites consensus potentiels pour la phosphorylation par les MAP kinases, 4E-BP1 possède également des sites consensus pour la PKC {169} et la caséine kinase II (CKII) {170} qui sont différents de ceux des MAP kinases {162}.

L'utilisation de composés pharmacologiques augmentant ou inhibant certaines voies de signalisation est un outil très précieux pour l'étude du fonctionnement des voies métaboliques cellulaires. Par exemple, la forskoline augmente le taux d'AMPC dans les cellules en activant l'adénylyl cyclase {168}. Cette augmentation d'AMPC occasionne, dans certaines cellules, une diminution de la phosphorylation de PHAS-I/4E-BP1 qui peut être renversée par la stimulation avec le PDGF ou l'IGF-I (*insulin-like growth factor I*) {168}. Ceci est cohérent avec le fait que l'augmentation de l'AMP cyclique peut, dans certains types cellulaires, inhiber l'activation des MAP kinases {49,171-173} ou encore diminuer la synthèse de protéines. Par contre, dans différents types de cellules, l'activité des MAP kinases n'est pas modifiée par l'action de la forskoline {168}. Dans les CMLV, une augmentation de la concentration d'AMPC diminue la synthèse de protéine, sans modifier l'activité de ERK1 et 2 {86}. La rapamycine est un agent immunosuppresseur qui bloque la progression de la cellule dans la phase G1 du cycle cellulaire. La rapamycine forme un complexe avec FKBP12 (*FK506 binding protein*) chez l'humain {174-176} et bloque sélectivement

l'activation de la protéine $p70^{S6K}$, ce qui empêche la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 qui semble avoir un effet sur la stimulation de la synthèse protéique {177-180}. Le complexe rapamycine-FKBP12 se lie à la protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) {176}, aussi nommée FRAP {162} et mRAFT {174}. mTOR possède des analogies de structure avec la PI3K et se retrouve en amont de la $p70^{S6K}$ {178-180}. La figure 7 illustre les voies de signalisation impliquant la protéine mTOR {98}.

Des études ont montré que la rapamycine inhibe la traduction coiffe dépendante dans les cellules NIH 3T3. Cette action serait reliée à l'inhibition de la phosphorylation et de l'activation consécutive de 4E-BP1, ce qui résulte en une augmentation de la liaison à eIF4E {151,181}. Chez la levure, la rapamycine inhibe plus de 90% de la traduction tandis que chez les mammifères ce pourcentage varie de 15 à 60% selon le type de cellules {10}. La cinétique de phosphorylation de 4E-BP1 par le sérum est plus similaire à celle de la $p70^{S6K}$ qu'à celle des MAP kinases {182}. De plus, l'effet de l'insuline sur la phosphorylation de 4E-BP1 et sur l'activation de la $p70^{S6K}$ dans les cellules humaine 293 et Swiss 3T3 est bloqué par la rapamycine, le SQ20006 (un analogue de la méthylxanthine) et la wortmannine (un inhibiteur de la PI3K) {89}. Ces trois composés n'ont aucun effet sur l'activation de la voie des MAP kinases {182}. La protéine 4E-BP1 n'est cependant pas un substrat direct de la kinase $p70^{S6K}$, ce qui indique que la phosphorylation de 4E-BP1 serait due à l'action d'une kinase située en amont de la $p70^{S6K}$, comme FRAP/mTOR {162}. En fait, 4E-BP1 et la $p70^{S6K}$ pourraient être le substrat d'une même protéine kinase. Par contre, il existe aussi la possibilité que la rapamycine induise une déphosphorylation de 4E-BP1 en activant une phosphatase. L'hypothèse que les facteurs de croissance inhibent une phosphatase de 4E-BP1 doit aussi être prise en considération {151}.

L'inhibition des fonctions d'eIF4E par la rapamycine (via l'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1) est cohérent avec l'effet de la rapamycine sur la croissance cellulaire {154}. Après une heure de traitement avec la rapamycine, 4E-BP1 est complètement déphosphorylée alors que la traduction dépendante de la coiffe

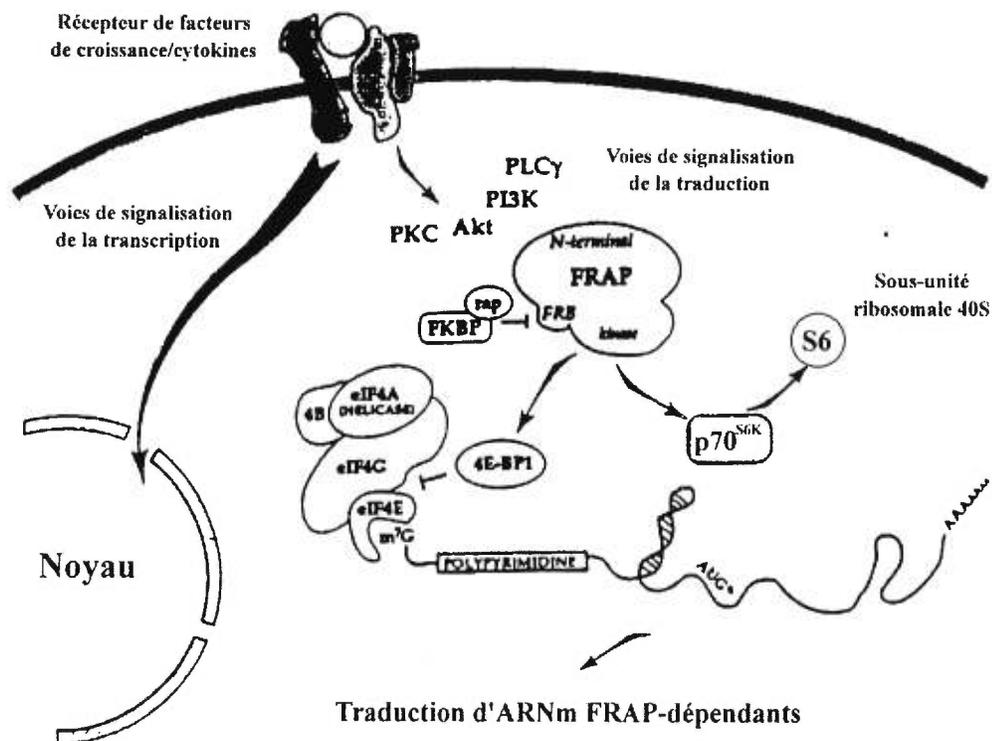


Figure 7: Représentation schématique des voies de signalisation impliquant la protéine mTOR/FRAP et menant au contrôle de la traduction suite à la stimulation par des facteurs de croissance.

Schéma adapté de Brown et Schreiber, 1996 {98}

n'est inhibée que plus tard et seulement partiellement. Ceci peut être expliqué par le fait que eIF4E échange lentement à travers le complexe eIF4F et n'interagirait avec 4E-BP1 déphosphorylée que seulement après son relargage de eIF4F. De cette façon, l'inhibition traductionnelle serait dépendante des quantités relatives de eIF4E, eIF4F, eIF4G et 4E-BP1 et de leur affinité de liaison relative. Ainsi les effets d'inhibition de la rapamycine sur la croissance cellulaire peuvent être expliqués, en partie du moins, comme une conséquence de la diminution de la phosphorylation de 4E-BP1 et des fonctions de eIF4E {181}.

Le composé PD 98059 est un inhibiteur spécifique de MEK qui empêche donc par conséquent l'activation des MAP kinases ERK1/ERK2 {79,80}. Il est donc très utile pour vérifier l'implication de la voie des ERKs dans la phosphorylation de 4E-BP1. Les études réalisées avec ce composé ont démontré aucun effet sur la phosphorylation de 4E-BP1 et sur l'association du complexe eIF4E-4E-BP1 {151,167}.

Dans l'ensemble, ces observations indiquent que la phosphorylation de 4E-BP1 implique plus d'une voie de signalisation et que l'implication des MAP kinases dans la phosphorylation (*in vivo*) de 4E-BP1 est grandement mise en doute pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la phosphorylation de 4E-BP1 induite par des facteurs de croissance tels que l'insuline et l'AII est inhibée par la rapamycine dans les CMLV et NIH 3T3, alors que les MAP kinases ne sont pas affectées {167,181}. En second lieu, l'inhibiteur spécifique de MEK, n'a aucun effet sur la phosphorylation de 4E-BP1 {151,167}. L'IGF-I (*insulin-like growth factor I*) augmente la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLA (cellules de muscle lisse aortique) et dans les cellules humaines 293 sans augmenter l'activité de ERK1 et ERK2 dans les deux cas {167,182}. Enfin, l'inhibiteur spécifique de la PI3K, la wortmannine, inhibe également la phosphorylation de 4E-BP1 sans diminuer l'activité des MAP kinases {182}. Bien que la protéine kinase responsable n'ait pas encore été identifiée, la phosphorylation de 4E-BP1 semble être sous le contrôle, en partie du moins, de la voie de transmission du signal FRAP/mTOR qui est sensible à la rapamycine

{136,181,182}. Il existe au moins trois voies de signalisation distinctes impliquées dans le contrôle de l'initiation de la traduction des ARNm. En premier lieu, les voies des MAP kinases et de la PKC sont impliquées dans la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E alors que la voie FRAP/mTOR sensible à la rapamycine semble impliquée dans la phosphorylation de la protéine régulatrice 4E-BP1/PHAS-I {150,151,168,181}.

La régulation de la protéine 4E-BP1 en réponse à la stimulation de cellules par l'AII a fait l'objet du travail présenté ici. Notre but est de mieux comprendre les voies qui contrôlent la synthèse de protéines dans les CMLV étant donné l'importance de ce processus au sein du métabolisme cellulaire et des pathologies du système cardiovasculaire.

CHAPITRE 2

MANUSCRIT

Résumé du manuscrit

Pour étudier les bases moléculaires de l'actions hypertrophique de l'angiotensine II (AII) dans les cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV), nous avons examiné la capacité de l'hormone de régler la fonction du répresseur de la traduction 4E-BP1. L'ajout d'AII à des cellules de muscle lisse aortique de rats (CMLA) augmente puissamment la phosphorylation de 4E-BP1 tel que démontré par la diminution de mobilité électrophorétique et par l'augmentation du contenu en phosphate de la protéine. La stimulation de la phosphorylation de 4E-BP1 est maximale à 15 minutes après traitement par l'AII et persiste pour 120 minutes. Les résultats d'analyses par chromatographie d'affinité, sur colonne m⁷GTP-agarose, démontrent que la phosphorylation induite par l'AII diminue l'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E et favorise la dissociation du complexe 4E-BP1/eIF4E dans les cellules cibles. Une caractérisation plus approfondie de la phosphorylation de 4E-BP1, par l'analyse des acides aminés phosphorylés de cartes phosphopeptidiques, a permis de déterminer que suite à la stimulation par l'AII, 4E-BP1 est phosphorylée sur au moins huit résidus sérine et thréonine distincts. La combinaison des résultats obtenus suite aux expériences cinétiques, aux analyses des phosphopeptides *in vitro* et *in vivo* de la protéine 4E-BP1 phosphorylée ainsi qu'aux études pharmacologiques réalisées avec un inhibiteur de MEK, le PD 98059, suggère fortement que les MAP kinases ERK1/2 ne sont pas impliquées dans la régulation de la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLA. L'ensemble de nos résultats démontrent que le traitement des CMLV avec l'AII mène à une hyperphosphorylation du régulateur traductionnel 4E-BP1 et à sa dissociation du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E selon un mécanisme indépendant des MAP kinases ERK1/2.

Angiotensin II Stimulates Phosphorylation of the Translational Repressor 4E-binding Protein 1 by a Mitogen-activated Protein Kinase-independent Mechanism*

(Received for publication, June 24, 1996, and in revised form, October 8, 1996)

Manon Fleurent^{‡§}, Anne-Claude Gingras^{||}, Nahum Sonenberg[¶], and Sylvain Meloche^{‡**}

From the [‡]Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal and Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8 and the ^{||}Department of Biochemistry and McGill Cancer Centre, McGill University, Montreal, Quebec, H3G 1Y6 Canada

To investigate the molecular basis of the hypertrophic action of angiotensin II (AII) in vascular smooth muscle cells (SMC), we have examined the ability of the hormone to regulate the function of the translational repressor 4E-binding protein 1 (4E-BP1). Addition of AII to quiescent aortic SMC potently increased the phosphorylation of 4E-BP1 as revealed by a decreased electrophoretic mobility and an increased phosphate content of the protein. The stimulation of 4E-BP1 phosphorylation was maximal at 15 min and persisted up to 120 min. Results from affinity chromatography on m⁷GTP-agarose demonstrated that AII-induced phosphorylation of 4E-BP1 promotes its dissociation from eIF4E in target cells. Further characterization of 4E-BP1 phosphorylation by phosphoamino acid analysis and phosphopeptide mapping revealed that 4E-BP1 is phosphorylated on eight distinct peptides containing serine and threonine residues in AII-treated cells. The combination of results obtained from kinetics experiments, phosphopeptide analysis of *in vitro* and *in vivo* phosphorylated 4E-BP1, and pharmacological studies with the MAP kinase kinase inhibitor PD 98059 provided strong evidence that the MAP kinases ERK1/ERK2 are not involved in the regulation of 4E-BP1 phosphorylation in aortic SMC. Together, our results demonstrate that AII treatment of vascular SMC leads to hyperphosphorylation of the translational regulator 4E-BP1 and to its dissociation from eIF4E by a MAP kinase-independent mechanism.

The peptide hormone angiotensin II (AII)¹ potently stimulates protein synthesis and induces cellular hypertrophy in cultured rat vascular SMC (1–4). This growth-promoting effect is mediated by the AT₁ receptor subtype, a member of the G

protein-coupled receptors superfamily (4, 5). However, the molecular basis for the hypertrophic action of the hormone remains largely unknown. In vascular SMC, the augmented rate of protein synthesis induced by AII is associated with a widespread but selective increase in the content of highly abundant extracellular matrix (6–8) and contractile proteins (9). The increased synthesis of proteins like α -actin, collagen, or thrombospondin is accompanied by a corresponding increase in their specific mRNAs, which is indicative of the importance of transcriptional control in the overall stimulation of protein synthesis (6–9). In agreement with this notion, the transcriptional inhibitor actinomycin D can prevent AII-induced accumulation of proteins in chronically stimulated vascular SMC (2).² On the other hand, the global nature of the trophic effect of AII suggests that regulatory changes at the translational level are likely to be involved in the hormone response.

The major locus of regulation in protein synthesis is generally at the initiation step of mRNA translation (for review, see Refs. 10–12). This step is controlled by the concerted action of a number of initiation factors which are extensively regulated by phosphorylation/dephosphorylation mechanisms (13, 14). The rate-limiting step in translation initiation is the binding of mRNA to the small 40 S ribosomal subunit, which requires the participation of initiation factor eIF4F (15). eIF4F exists as a protein complex composed of three polypeptides: eIF4E (the cap-binding protein), eIF4G, and eIF4A, a RNA helicase. The interaction of eIF4F with the mRNA, followed by the unwinding of the mRNA 5' secondary structure facilitates the attachment of the 40 S ribosomal subunit which moves along the mRNA scanning for the initiator AUG codon (10–12, 15).

eIF4E is the least abundant among all initiation factors and thus a critical regulatory component of the protein synthetic machinery (16, 17). Overexpression of eIF4E leads to deregulation of cell growth (18) and oncogenic transformation (19), whereas its depletion decreases protein synthesis (20). The activity of eIF4E is regulated by 4E-BP1 (also known as PHAS-I) and 4E-BP2, two recently identified proteins which specifically bind to eIF4E and inhibit cap-dependent translation (21, 22). Phosphorylation of 4E-BP1 in response to insulin causes its dissociation from eIF4E, thereby relieving translational inhibition (21, 22). 4E-BP1 is phosphorylated by ERK2 on a single serine residue *in vitro* (23), and this phosphorylation markedly decreases the affinity of the protein for eIF4E (22). In cultured adipocytes, the epidermal growth factor-stimulated 4E-BP1 kinase activity elutes in two peaks that correspond to the peaks of ERK isoforms after anion exchange chromatography (29). Based on these observations, it has been proposed that MAP kinases mediate growth factor-stimulated

* This work was supported in part by a grant from the Medical Research Council of Canada. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of a studentship from the Medical Research Council of Canada.

|| Recipient of a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

** Scholar of the Medical Research Council of Canada. To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal, 3850 St. Urbain Street, Montréal, Québec, H2W 1T8 Canada. Tel.: 514-843-2733; Fax: 514-843-2715.

¹ The abbreviations used are: AII, angiotensin II; SMC, smooth muscle cells; MAP, mitogen-activated protein; eIF, eukaryotic initiation factor; 4E-BP, eIF4E-binding protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GST, glutathione S-transferase; TBS, Tris-buffered saline; p70^{S6K}, p70 S6 kinase; PVDF, polyvinylidene difluoride; MEK, MAP kinase/ERK kinase; PHAS-I, phosphorylated heat- and acid-stable protein regulated by insulin.

² E. Giasson and S. Meloche, unpublished results.

phosphorylation of 4E-BP1 in intact cells (22). However, more recent data cast doubt on this hypothesis (Refs. 24–26; this study).

To understand the cellular mechanisms involved in the hypertrophic action of AII, we have examined the regulation of 4E-BP1 function by AII in aortic SMC. We report that AII potently stimulates phosphorylation of 4E-BP1 and promotes the dissociation of 4E-BP1 and eIF4E. The phosphorylation of 4E-BP1 occurs on multiple serine and threonine residues. In addition, we demonstrate that the MAP kinases ERK1/ERK2 are not involved in the phosphorylation of 4E-BP1 in our *in vivo* model.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and Antibodies—The source of materials has been described (4). PD 98059 was a generous gift of Parke-Davis. Antiserum 11208 was produced by immunization of rabbits with purified recombinant GST-4E-BP1 fusion protein. This antiserum specifically recognizes the native and denatured forms of 4E-BP1. The anti-MAP kinase peptide antiserum specifically immunoprecipitates the MEK1 isoform of MAP kinase kinases (27). Antiserum SM1 has been described and specifically immunoprecipitates ERK1 (p44^{mapk}) isoform (28).

Cell Culture—Rat aortic SMC were cultured and synchronized as described previously (4). Rat1-AT₁ cells are Rat1 fibroblasts stably expressing the human AII AT₁ receptor.³ Rat1-AT₁ cells were grown in minimum essential medium supplemented with 10% calf serum, 2 mM glutamine, antibiotics (50 μg/ml streptomycin and 50 units/ml penicillin), and 0.4 mg/ml geneticin. They were made quiescent by incubating confluent cell cultures in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 containing 15 mM Hepes (pH 7.4) and 0.1% bovine serum albumin for 24 h.

Immunoblot Analysis of 4E-BP1—Quiescent aortic SMC in 10-cm Petri dishes were stimulated with AII for the indicated times at 37 °C. The cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, scraped in buffer A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA), and lysed by three freeze-thaw cycles. Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 × *g* for 5 min and the concentration of protein was measured using the Coomassie protein assay kit (Pierce). Normalized amounts of lysate proteins (~500 μg) were boiled for 7 min, and then cooled on ice prior to centrifugation at 13,000 × *g* for 5 min at 4 °C. Heat-soluble proteins were precipitated by addition of trichloroacetic acid (final concentration of 15%) and incubation on ice for 30 min. After centrifugation for 10 min, the supernatant was removed, and the remaining trichloroacetic acid was extracted with diethyl ether. The final pellet of proteins was resuspended in Laemmli sample buffer.

Heat-stable proteins were separated on 15% acrylamide gels and electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine. After fixation for 30 min in 40% methanol, 7% acetic acid, 3% glycerol, the membrane was blocked for 1 h at 37 °C in TBS containing 3% non-fat dry milk. The membrane was then incubated for 2 h at 25 °C with antiserum 11208 (1:1000) in blocking buffer. The membrane was washed twice with TBS, twice with TBS, 0.1% Tween 20, and twice with TBS prior to incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) diluted 1:10,000 in TBS, 0.1% Tween 20, 1% milk for 1 h. After washing as above, the immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham).

Preparation of Recombinant Proteins—The recombinant GST-4E-BP1 protein was expressed in *Escherichia coli* and purified as described (29). Plasmid pGST-ERK1 was created by subcloning the *EcoRI* fragment encoding hamster ERK1 from plasmid pCMV/HAPMK (30) into the *EcoRI* site of pGEX-KG (31). The recombinant GST-ERK1 protein was expressed in *E. coli* by transformation with plasmid pGST-ERK1 and adsorbed to glutathione-agarose beads. Purified recombinant ERK1 (p44^{mapk}) was obtained by cleavage of the GST-ERK1 fusion protein with thrombin directly on beads (31).

Association of 4E-BP1 with eIF4E *In Vivo*—The association of 4E-BP1 with eIF4E was evaluated by determining the ability of 4E-BP1 to bind to m⁷GTP-agarose beads through its interaction with eIF4E. Quiescent aortic SMC in 10-cm Petri dishes were stimulated or not with 100 nM AII for 15 min at 37 °C. The cells were then washed twice with

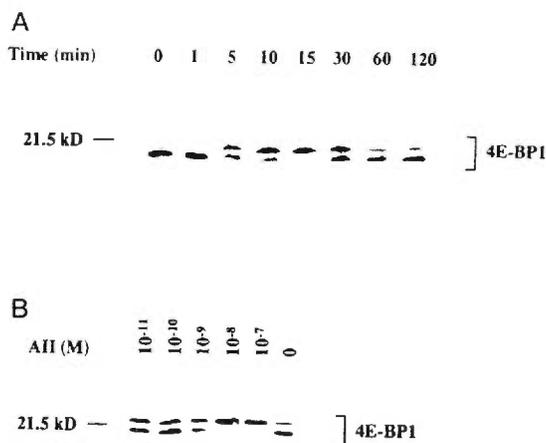


FIG. 1. AII stimulates phosphorylation of 4E-BP1 in aortic SMC. Rat aortic SMC were made quiescent by incubation in serum-free medium for 48 h. The cells were then stimulated with AII for the indicated times and lysed by repeated cycles of freezing and thawing. Normalized amounts of lysate proteins were treated at 95 °C, and heat-soluble proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 15% acrylamide gel, and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-4E-BP1 serum 11208 and the proteins visualized by chemiluminescence detection. The position of 4E-BP1 bands is indicated. *A*, time course of AII (100 nM) stimulation of 4E-BP1 phosphorylation. *B*, dose-response curve for the stimulatory effect of AII on 4E-BP1 phosphorylation after 15 min of stimulation. The data presented are representative of three independent experiments with similar results.

phosphate-buffered saline, scraped in buffer C (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 0.1 mM vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A), and lysed by 3 cycles of freezing and thawing. Insoluble material was removed by centrifugation and protein concentration was measured using the Bradford assay kit (Pierce). The lysate (200 μg of protein) was incubated for 30 min with 25 μl of m⁷GTP-agarose beads equilibrated in buffer C. After three washes in buffer C, the proteins were eluted directly in Laemmli sample buffer, subjected to SDS-gel electrophoresis on 15% acrylamide gel, and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blocked, and probed sequentially with antiserum 11208 (1:1,000) and with a mouse eIF4E antibody (1:500; Transduction Laboratories) as described above. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence.

³²P Labeling and Immunoprecipitation—Quiescent rat aortic SMC in 100-mm Petri dishes were metabolically labeled for 5 h at 37 °C in bicarbonate and phosphate-free Hepes-buffered minimum essential medium containing 0.5 mCi/ml [³²P]phosphoric acid. The cells were stimulated with 100 nM AII and cell lysates were prepared as described previously without heat treatment (4). The lysates were precleared for 1 h with 5 μl of normal rabbit serum and incubated for 2 h at 4 °C with 5 μl of antiserum 11208 preadsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complexes were washed six times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted from the beads by heating at 95 °C for 5 min in Laemmli sample buffer and resolved by SDS-gel electrophoresis on 15% acrylamide gels.

***In Vitro* Phosphorylation of 4E-BP1**—Quiescent aortic SMC were stimulated with 100 nM AII for 5 min at 37 °C. Cell lysates were prepared as described (4) and incubated for 4 h at 4 °C with 5 μl of anti-MAP kinase kinase serum preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immune complexes were washed three times with lysis buffer, once with kinase assay buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate), and then resuspended in kinase assay buffer containing 200 μM ATP, 10 μCi of [³²P]ATP, and 1 μg of recombinant ERK1. After incubation at 30 °C for 30 min, purified recombinant GST-4E-BP1 (10 μg) was added and the reaction was continued for an additional 60 min. The reaction was stopped by addition of 2 × Laemmli sample buffer and the proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis. Control incubations were performed in the absence of ERK1 or GST-4E-BP1.

³ S. Meloche, M. J. Servant, I. Leduc and J. Pellerin, submitted for publication.

4008

AII-induced Phosphorylation of 4E-BP1



FIG. 2. Effect of AII receptor antagonists on AII stimulation of 4E-BP1 phosphorylation. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min in the absence or presence of the AT_1 selective antagonist losartan (10^{-5} M) or the AT_2 -selective antagonist PD 123319 (3×10^{-6} M). The cells were then stimulated with medium (*cont*) or 100 nM AII for 15 min. Heat-soluble proteins were extracted and the phosphorylation of 4E-BP1 was analyzed by immunoblotting as described in the legend to Fig. 1. Similar results were obtained in three separate experiments.

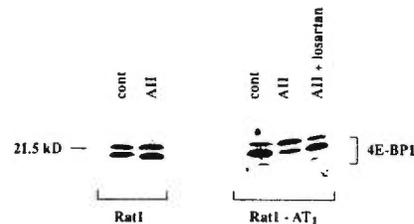


FIG. 3. Stimulation of 4E-BP1 phosphorylation by AII in rat fibroblasts expressing the human AT_1 receptor. Parental Rat1 or Rat1- AT_1 cells were made quiescent by serum deprivation for 24 h. The cells were then stimulated for 15 min with 100 nM AII. The specificity of the AII response was confirmed by preincubating the cells for 30 min with 10^{-5} M losartan prior to stimulation. Heat-soluble proteins were extracted and the phosphorylation of 4E-BP1 was analyzed by immunoblotting as described in the legend to Fig. 1. Similar results were obtained in two independent experiments.

Peptide Mapping and Phosphoamino Acid Analysis— ^{32}P -Labeled 4E-BP1 from immunoprecipitates of metabolically labeled aortic SMC or from *in vitro* phosphorylation reactions was subjected to SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels. For phosphoamino acid analysis, the proteins were electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol and visualized by autoradiography. The labeled bands corresponding to 4E-BP1 were excised and subjected to partial acid hydrolysis in 5.7 M HCl for 1 h at 110 °C (32). The resulting phosphoamino acids along with unlabeled phosphoamino acid standards (0.2 mg/ml) were resolved by one-dimensional thin layer electrophoresis using an optimized pH 2.5 buffer (33). The standards were visualized by ninhydrin staining and the labeled amino acids by autoradiography. For phosphopeptide mapping, the labeled proteins were transferred to PVDF membranes, and the 4E-BP1 bands were cut out and directly digested with 40 μ g of trypsin for 19 h at 37 °C in 50 mM NH_4HCO_3 (34). An additional aliquot of trypsin was added, and the reaction was incubated for a further 5 h. The reaction mixture was then diluted with water, dried under vacuum, and redissolved in pH 1.9 buffer. The phosphopeptides were separated by thin layer electrophoresis in pH 1.9 buffer for 45 min at 1,000 V in the first dimension followed by ascending chromatography in phosphochromatography buffer in the second dimension (35). The plates were revealed either by autoradiography or by PhosphorImaging analysis.

ERK Assays—Quiescent aortic SMC in 60-mm Petri dishes were stimulated with 100 nM AII for 5 min at 37 °C. The phosphotransferase activity of ERK1 and ERK2 was measured by specific immune complex kinase assays using myelin basic protein as substrate as described previously (4, 28).

RESULTS

AII Stimulates Phosphorylation of 4E-BP1 in Aortic SMC—To gain understanding in the cellular mechanisms involved in the induction of protein synthesis by AII, we examined the ability of the peptide to regulate the phosphorylation and function of the translational repressor 4E-BP1. Quiescent

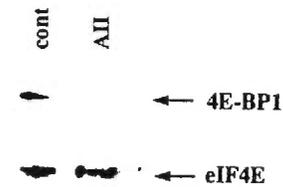


FIG. 4. AII stimulation of 4E-BP1 phosphorylation promotes its dissociation from eIF4E in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were stimulated or not with 100 nM AII for 15 min. Cell lysates were prepared and incubated with m^7GTP -agarose beads for 30 min at 25 °C. After washing, the proteins were eluted in Laemmli sample buffer, resolved by SDS-gel electrophoresis on 15% acrylamide gel, and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was probed sequentially with antiserum 11208 to 4E-BP1 and anti-eIF4E antibody. The proteins were visualized by chemiluminescence detection. The data presented are representative of three independent experiments with similar results.

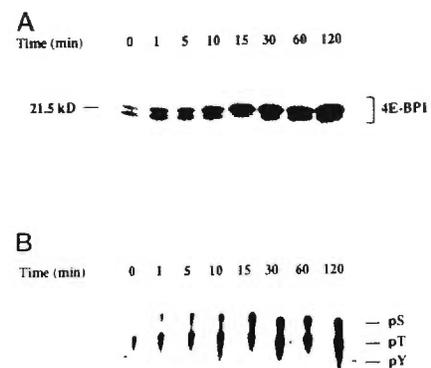


FIG. 5. 4E-BP1 is phosphorylated on serine and threonine residues. A, quiescent rat aortic SMC were labeled with [^{32}P]phosphoric acid for 5 h and then stimulated with 100 nM AII for the indicated times. The cells were lysed, and 4E-BP1 was immunoprecipitated using antiserum 11208 preadsorbed to protein A-Sepharose beads. After extensive washing of the beads, the immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 15% acrylamide gel and transferred to PVDF membrane prior to autoradiography. The position of 4E-BP1 bands is indicated. B, phosphoamino acid analysis of 4E-BP1. The ^{32}P -labeled protein bands corresponding to 4E-BP1 in panel A were excised from the PVDF membrane and subjected to partial acid hydrolysis. The phosphorylated amino acids were separated by one-dimensional thin layer electrophoresis. pS, phosphoserine; pT, phosphothreonine; pY, phosphotyrosine. Similar results were obtained in two separate experiments.

cultures of rat aortic SMC were stimulated with 100 nM AII for different times, and lysates of the cells were subjected to immunoblot analysis with antiserum against 4E-BP1. As shown in Fig. 1A, addition of AII resulted in a clear retardation of 4E-BP1 migration on SDS-polyacrylamide gels, indicative of increased phosphorylation of the protein (22, 24, 25). Three protein bands could be detected in these cells which represent 4E-BP1 phosphorylated to different stoichiometries (24, 25). The effect of AII on 4E-BP1 was detectable at 5 min, reached a maximum at 15 min, and remained elevated for at least 120 min. The same results were obtained when we analyzed the phosphorylation state of 4E-BP1 after immunoprecipitation from lysates of ^{32}P -labeled cells stimulated with AII (Fig. 5A). To assess the physiological relevance of 4E-BP1 phosphorylation, quiescent aortic SMC were incubated with different concentrations of AII. AII stimulated the phosphorylation of 4E-BP1 in a dose-dependent manner, with a half-maximal effect observed at approximately 1 nM AII (Fig. 1B). This concentra-

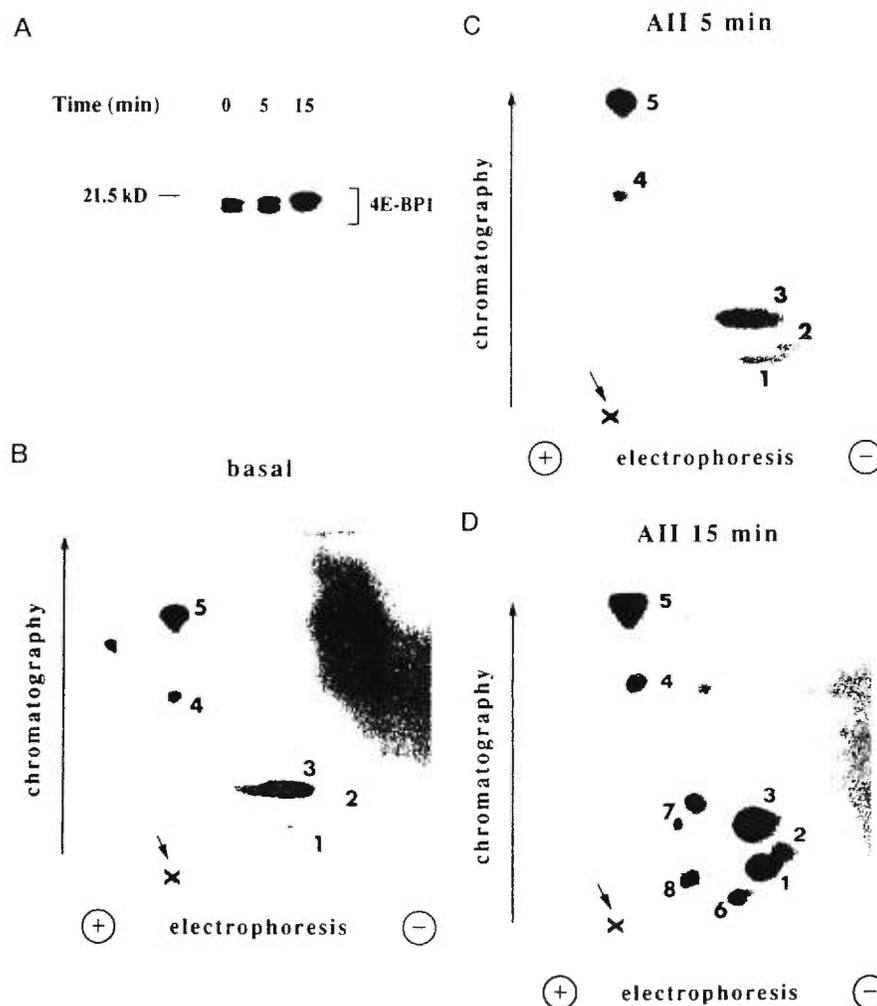


FIG. 6. **Phosphopeptide mapping of 4E-BP1 in quiescent and AII-stimulated aortic SMC.** Quiescent rat aortic SMC were labeled with [32 P]phosphoric acid for 5 h and then stimulated or not (*basal*) with 100 nM AII for the indicated times. 4E-BP1 was immunoprecipitated from cell lysates as described in the legend to Fig. 5. The labeled proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gel and transferred to PVDF membrane. An autoradiogram of the membrane is shown (*panel A*). The 32 P-labeled 4E-BP1 protein bands were excised and extensively digested with trypsin. The phosphopeptides were separated by thin-layer electrophoresis followed by ascending chromatography. The major tryptic peptides were labeled from 1 to 8. The arrow denotes the position of sample application. The amount of radioactivity applied to each plate was: *panel B*, 480 cpm; *panel C*, 460 cpm; and *panel D*, 700 cpm. The data presented are representative of three independent experiments with similar results.

tion is comparable to the ED_{50} value (0.5 nM) of the hormone for the stimulation of protein synthesis in aortic SMC (4). We also determined which subtype of AII receptors was involved in the phosphorylation of 4E-BP1. Fig. 2 shows that incubation of aortic SMC with the AT_1 -selective antagonist losartan completely suppressed AII-induced phosphorylation of 4E-BP1, whereas the AT_2 antagonist PD 123319 had no effect.

To further demonstrate the significance of 4E-BP1 phosphorylation, we examined the effect of AII in a rat fibroblast cell line expressing a physiological number of human AT_1 receptors (Rat1- AT_1).³ We have previously shown that AII increases the rate of protein synthesis in Rat1- AT_1 cells, similar to its effect on vascular SMC. Treatment of Rat1- AT_1 cells with AII also resulted in a significant increase in the phosphorylation of 4E-BP1 which was prevented by preincubating the cells with losartan (Fig. 3). By contrast, no effect of AII was observed in

untransfected Rat1 cells (Fig. 3). Together, these results demonstrate that AII stimulates phosphorylation of 4E-BP1 through activation of the AT_1 receptor in target cells.

Phosphorylation of 4E-BP1 by AII Decreases Its Affinity for eIF4E—The increased phosphorylation of 4E-BP1 observed with insulin or serum stimulation is associated with a decreased binding of 4E-BP1 to eIF4E (21, 22, 25). To determine if AII-dependent phosphorylation of 4E-BP1 decreases the affinity of the protein for eIF4E, we measured the amount of 4E-BP1 that was recovered by affinity chromatography of cellular lysates through a m^7 GTP-agarose resin. Proteins bound to the resin were eluted with SDS sample buffer and analyzed by immunoblotting with antisera to 4E-BP1 and eIF4E. AII treatment caused a striking reduction in the amount of 4E-BP1 that bound to the cap column, without affecting the binding of eIF4E to the column (Fig. 4). Neither protein was found to

4010

AII-induced Phosphorylation of 4E-BP1

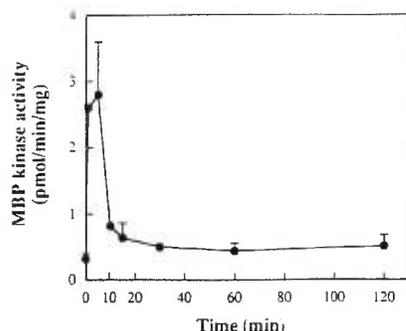


FIG. 7. Time course of AII-stimulated ERK1 activation in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were treated with 100 nM AII for the indicated periods of time. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-ERK1 serum SM1 preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immune complexes were washed and phosphotransferase activity was assayed directly using myelin basic protein as substrate. The enzymatic activities are expressed as picomoles of phosphate incorporated into the substrate per min per mg of lysate protein and represent the mean \pm S.E. of duplicate determinations. The data presented are representative of several experiments with similar results.

interact with the control resin without the cap homolog (not shown). These results clearly indicate that AII-stimulated phosphorylation of 4E-BP1 in aortic SMC promotes the dissociation of 4E-BP1 from eIF4E *in vivo*.

AII Stimulates Phosphorylation of 4E-BP1 on Multiple Serine and Threonine Residues—As a first step toward the characterization of the regulatory phosphorylation sites of 4E-BP1, 32 P-labeled aortic SMC were stimulated with AII for different times, and 4E-BP1 was immunoprecipitated from cell lysates (Fig. 5A). The labeled bands corresponding to 4E-BP1 were then subjected to phosphoamino acid analysis. In quiescent cells, 4E-BP1 was found to be phosphorylated on serine and threonine residues with a predominance of phosphothreonine (Fig. 5B). Stimulation of cells with AII resulted in a significant increase in both the phosphoserine and phosphothreonine content of 4E-BP1 at each time studied (Fig. 5B). No phosphotyrosine was detected in either control or stimulated cells.

The phosphorylation sites of 4E-BP1 were further analyzed by two-dimensional phosphopeptide mapping. For these experiments, the 32 P-labeled 4E-BP1 protein species isolated from extracts of control or AII-treated cells were subjected to extensive trypsin digestion, and the resulting peptides were separated by electrophoresis and ascending chromatography. Representative phosphopeptide maps are shown in Fig. 6. The tryptic peptide map of labeled 4E-BP1 isolated from unstimulated quiescent cells consisted of three major spots (spots 3, 4, and 5) and two minor spots (spots 1 and 2). No significant change in the 32 P content of spots 1–5 was observed in cells stimulated with AII for 5 min (Fig. 6C), consistent with the low level of phosphorylation of 4E-BP1 (Fig. 6A). However, when the cells were treated with the hormone for 15 min, the 32 P content of all five existing spots increased to varying degrees, and three additional phosphopeptides (labeled 6, 7, and 8) appeared *de novo* (Fig. 6D). The largest increase in relative 32 P content was seen in spot 1. These results demonstrate that 4E-BP1 is phosphorylated on multiple serine and threonine residues in AII-treated aortic SMC.

Lack of Involvement of ERK1/ERK2 in the Phosphorylation of 4E-BP1 Induced by AII—It has been initially suggested that MAP kinase is the main enzyme mediating insulin-stimulated phosphorylation of 4E-BP1 in rat adipocytes (22). However, more recent studies have seriously questioned the involvement

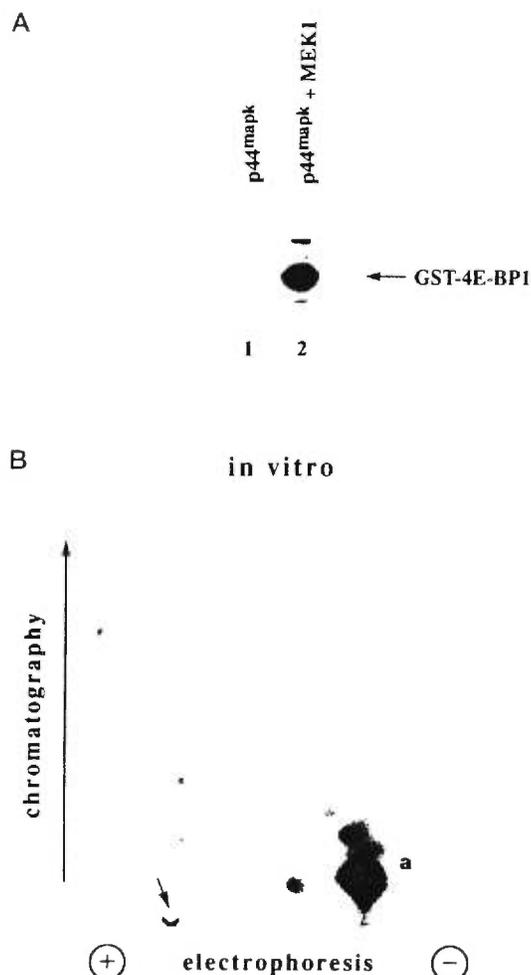


FIG. 8. Phosphorylation of 4E-BP1 by ERK1. A, recombinant GST-4E-BP1 was incubated at 30 °C for 60 min with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and recombinant ERK1 (p44^{mapk}) preincubated in the absence or presence of activated MEK1 adsorbed on agarose beads. The reaction mixture was resolved by SDS-gel electrophoresis and transferred to PVDF membrane. An autoradiogram of the membrane is shown. The position of 4E-BP1 is indicated. B, phosphopeptide map of 4E-BP1 phosphorylated by ERK1 *in vitro*. The 32 P-labeled 4E-BP1 protein band from panel A was excised from the membrane and digested with trypsin. The tryptic phosphopeptides were separated by thin-layer electrophoresis followed by ascending chromatography. The major MAP kinase-phosphorylated peptide was labeled a.

of ERK1/ERK2 in the phosphorylation of 4E-BP1 *in vivo* (24–26). Since AII strongly stimulates the enzymatic activity of ERK isoforms in aortic SMC (4, 36–38), we tested the hypothesis that ERK1/ERK2 could be involved in the phosphorylation of 4E-BP1 in AII-stimulated cells. We first examined the time course of activation of ERK1/ERK2 in AII-stimulated aortic SMC. Fig. 7 shows that the activation of ERK1 is rapid and transient, reaching a maximum between 1 and 5 min, and then declining rapidly to low levels at 15 min. The same kinetics was observed for the ERK2 isoform (data not shown). Thus, the time course of activation of ERK isoforms does not correlate with that of 4E-BP1 phosphorylation which reaches a maximum at 15 min in these cells.

We next analyzed the sites on 4E-BP1 that become phospho-

rylated by the MAP kinase ERK1 *in vitro* by phosphopeptide mapping. Purified recombinant ERK1 (p44^{mapk}) was activated with MEK1 and incubated with recombinant GST-4E-BP1 in the presence of [γ -³²P]ATP. As previously reported (23), 4E-BP1 was found to be a good substrate for ERK1 *in vitro* (Fig. 8A). Analysis of the tryptic peptide map of 4E-BP1 phosphorylated by ERK1 revealed the presence of a single major spot (Fig. 8B). The identity of the phosphorylated site in this peptide has not been determined, but it likely corresponds to Ser-64 which was identified as the major ERK2 phosphorylation site in rat PHAS-I (23). The *in vitro* map was clearly different from the *in vivo* tryptic peptide map of 4E-BP1 isolated from AII-stimulated cells (Fig. 6D). Mixing experiments indicated that the ERK1-phosphorylated peptide (peptide a) comigrates with peptide 1 isolated from *in vivo* labeled cells (data not shown). However, the phosphorylation of this peptide was not increased at a time when ERK1/ERK2 activity is maximal in the cells (see Fig. 6C and Fig. 7).

We finally used the recently developed MEK inhibitor PD 98059 (39) to examine the involvement of the ERK pathway in 4E-BP1 phosphorylation. We have recently demonstrated that treatment of aortic SMC with 30 μ M PD 98059 almost completely suppresses AII-dependent activation of MEKs and, as a consequence, inhibits the activity of the two ERK isoforms (38). Quiescent aortic SMC were pretreated with PD 98059 prior to AII stimulation and the phosphorylation of 4E-BP1 was assessed by immunoblot analysis. As shown in Fig. 9, inactivation of the ERK pathway with PD 98059 did not affect AII-dependent phosphorylation of 4E-BP1 in these cells. These data indicate that the MAP kinases ERK1/ERK2 are not involved in the regulation of 4E-BP1 phosphorylation by AII in aortic SMC.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that AII increases the phosphorylation of 4E-BP1 and promotes the dissociation of 4E-BP1-eIF4E complexes in rat aortic SMC. These findings define a new mechanism by which the hormone exerts its trophic effects on target cells. To get an insight into the cellular events leading to 4E-BP1 phosphorylation, we have characterized the phosphorylation sites of the protein by phosphoamino acid analysis and two-dimensional tryptic peptide mapping. Results of these experiments revealed that 4E-BP1 is phosphorylated in growth-arrested aortic SMC on three major and two minor peptides containing serine or threonine residues. Treatment with AII for 15 min resulted in increased phosphorylation of the five tryptic peptides and generated three additional phosphopeptides *de novo*. These findings indicate that 4E-BP1 is phosphorylated on at least eight distinct regulatory sites in response to AII. Such multiple phosphorylation contrasts with initial reports which suggested that most, if not all, of the insulin-stimulated phosphorylation of PHAS-I (the rat homolog of 4E-BP1) occurs on a single serine site (23). While it is certainly conceivable that tyrosine kinase receptor agonists like insulin and G protein-coupled receptor agonists like AII use distinct second messengers and protein kinases to target 4E-BP1 phosphorylation, our results clearly demonstrate that the regulation of 4E-BP1 phosphorylation is more complex than originally described. Indeed, more recent data rather suggest that multiple sites in PHAS-I are phosphorylated upon insulin treatment (24).

We have specifically examined the relative contribution of the ERK pathway to the phosphorylation of 4E-BP1 using a combination of experimental approaches. The following arguments indicate that ERK isoforms are unlikely to be involved in the regulation of 4E-BP1 phosphorylation by AII. First, the kinetics of ERK1/ERK2 activation does not correlate with the increased phosphorylation of 4E-BP1 in AII-stimulated aortic

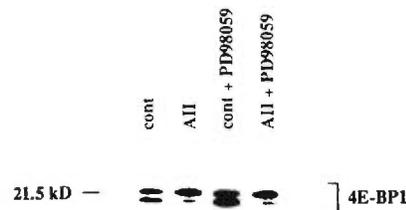


FIG. 9. Effect of the MEK inhibitor PD 98059 on AII-stimulated phosphorylation of 4E-BP1 in aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min with vehicle alone or with 30 μ M PD 98059. The cells were then stimulated or not (*cont*) with 100 nM AII for 15 min. Heat-soluble proteins were extracted and the phosphorylation of 4E-BP1 was analyzed by immunoblotting as described in the legend to Fig. 1. Similar results were obtained in three independent experiments.

SMC. Second, the phosphorylation of the major 4E-BP1 tryptic peptide phosphorylated by ERK1 *in vitro* is not increased at a time when ERK1/ERK2 activity is already maximal in AII-treated cells. Third, inhibition of ERK1 and ERK2 activation with the MEK inhibitor PD 98059 does not interfere with AII-dependent phosphorylation of 4E-BP1. Thus, the results presented here together with other findings (24–26) provide strong evidence that the ERK subfamily of MAP kinases is not involved in the phosphorylation of 4E-BP1 *in vivo*.

The signal transduction pathways coupling AT₁ receptor activation to the stimulation of 4E-BP1 phosphorylation remain to be established. The rat 4E-BP1 protein contains multiple consensus phosphoacceptor sites, including seven Ser/Thr-Pro motifs, one protein kinase C site, and four potential casein kinase II sites. In preliminary studies, we found that selective inhibition of protein kinase C or chelation of intracellular Ca²⁺ attenuate AII-dependent phosphorylation of 4E-BP1. These results suggest that protein kinase C might play a critical role in the regulation of 4E-BP1 function, either by phosphorylating the protein directly or by acting upstream of physiological 4E-BP1 kinases. Recent experiments showed that rapamycin, a selective inhibitor of p70^{S6K} activation, blocks the stimulation of 4E-BP1 phosphorylation by growth factors in several cell lines, providing pharmacological evidence for the involvement of a rapamycin-sensitive pathway in the regulation of 4E-BP1 function (24–26, 40).⁴ Since p70^{S6K} does not phosphorylate 4E-BP1 *in vitro* (23), the above results suggest that another protein serine/threonine kinase acting downstream of mTOR/FRAP mediates the phosphorylation of the protein. Finally, we cannot exclude the possibility that AII inhibits the activity of a protein serine/threonine phosphatase in aortic SMC. Studies are currently underway to determine the location of the regulatory phosphorylation sites on 4E-BP1 and to identify the AII signal transduction pathways leading to the increased phosphorylation of the protein.

The cellular mechanisms by which AII and G protein-coupled receptor agonists influence the global rate of protein synthesis to induce cell hypertrophy are still poorly understood. However, the recent observation that these factors regulate the phosphorylation state of translational components substantiate the idea that part of their action is exerted at the translational level. In addition to regulating the function of 4E-BP1 (this study), AII has been shown to increase the phosphorylation of eIF4E in vascular SMC (41). Although the consequence of such phosphorylation was not addressed in that study, there is a good correlation between the phosphorylation state of

⁴ M. Fleurent and S. Meloche, unpublished results.

eIF4E and the rate of protein synthesis in living cells (12, 14, 15). Another mechanism by which AII might stimulate translation is by phosphorylating the 40 S ribosomal protein S6 through the activation of p70^{S6K} (4). S6 phosphorylation has been closely correlated with the stimulatory effect of growth factors on translation (42, 43). Our observation that rapamycin treatment of aortic SMC inhibits up to 60–80% of AII-stimulated protein synthesis would be consistent with this notion. However, rapamycin also inhibits translation initiation by blocking 4E-BP1 phosphorylation and inactivating eIF4E (25). Future work will be required to delineate the relative contribution of each of these mechanisms to the global hypertrophic response.

Acknowledgments—We thank Drs. G. L'Allemain and J. Pouyssegur for supply of anti-MAP kinase kinase serum, Dr. Ronald Smith (Du Pont Merck) and Dr. Joan Keiser (Parke-Davis) for supply of losartan and PD 123319, respectively, and Dr. Alan Saltiel (Parke-Davis) for providing PD 98059. We also thank Elisabeth Pérès for preparation of the figures and Irène Rémillard for secretarial assistance.

REFERENCES

- Geisterfer, A. A. T., Peach, M. J., and Owens, G. K. (1988) *Circ. Res.* **62**, 749–756
- Berk, B. C., Vekshtein, V., Gordon, H. M., and Tsuda, T. (1989) *Hypertension* **13**, 305–314
- Itoh, H., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**, 1690–1697
- Giasson, E., and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5225–5231
- Chiu, A. T., Roscoe, W. A., McCall, D. E., and Timmermans, P. B. M. W. M. (1991) *Receptor* **1**, 133–140
- Scott-Burden, T., Resink, T. J., Hahn, A. W. A., and Bühler, F. R. (1990) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**, S17–S20
- Scott-Burden, T., Hahn, A. W. A., Resink, T. J., and Bühler, F. R. (1990) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **16**, S36–S41
- Kato, H., Suzuki, H., Tajima, S., Ogata, Y., Tominaga, T., Sato, A., and Saruta, T. (1991) *J. Hypertens.* **9**, 17–22
- Turla, M. B., Thompson, M. M., Corjay, M. H., and Owens, G. K. (1991) *Circ. Res.* **68**, 288–299
- Hershey, J. W. B. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 717–755
- Merrick, W. C. (1992) *Microbiol. Rev.* **56**, 291–315
- Redpath, N. T., and Proud, C. G. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1220**, 147–162
- Hershey, J. W. B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20823–20826
- Rhoads, R. E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3017–3020
- Sonenberg, N. (1996) in *Translational Control* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., and Sonenberg, N., eds) pp. 245–269, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Hiremath, L. S., Webb, N. R., and Rhoads, R. E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7843–7849
- Duncan, R., Milburn, S. C., and Hershey, J. W. B. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 380–388
- De Benedetti, A., and Rhoads, R. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8212–8216
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., and Sonenberg, N. (1990) *Nature* **345**, 544–547
- De Benedetti, A., Joshi-Barve, S., Rinker-Schaeffer, C., and Rhoads, R. E. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5435–5445
- Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donzé, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr., and Sonenberg, N. (1994) *Nature* **371**, 762–767
- Lin, T. A., Kong, X., Haystead, T. A. J., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., and Lawrence, J. C., Jr. (1994) *Science* **266**, 653–656
- Haystead, T. A. J., Haystead, C. M. M., Hu, C., Lin, T.-A., and Lawrence, J. C., Jr. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23185–23191
- Lin, T.-A., Kong, X., Saltiel, A. R., Blackshear, P. J., and Lawrence, J. C., Jr. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18531–18538
- Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N., and Sonenberg, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 658–664
- von Manteuffel, S. R., Gingras, A.-C., Ming, X.-F., Sonenberg, N., and Thomas, G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4076–4080
- Pagès, G., Brunet, A., L'Allemain, G., and Pouyssegur, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 3003–3010
- Meloche, S. (1995) *J. Cell. Physiol.* **163**, 577–588
- Méthot, N., Pause, A., Hershey, J. W. B., and Sonenberg, N. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2307–2316
- Meloche, S., Pagès, G., and Pouyssegur, J. (1992) *Mol. Biol. Cell.* **3**, 63–71
- Guan, K. L., and Dixon, J. E. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 262–267
- Kamps, M. P. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 21–27
- Jelinek, T., and Weber, M. J. (1993) *BioTechniques* **15**, 629–630
- Luo, K., Hurley, T. R., and Sefton, B. M. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 149–152
- Boyle, W. J., van des Geer, P., and Hunter, T. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 110–149
- Tsuda, T., Kawahara, Y., Ishida, Y., Koide, M., Shii, K., and Yokoyama, M. (1992) *Circ. Res.* **71**, 620–630
- Duff, J. L., Berk, B. C., and Corson, M. A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 257–264
- Servant, M. J., Giasson, E., and Meloche, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16047–16052
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., and Saltiel, A. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7686–7689
- Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Argast, G. M., Krebs, E. G., Kong, X., Lin, T. A., and Lawrence, J. C., Jr. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7222–7226
- Rao, G. N., Griendling, K. K., Frederickson, R. M., Sonenberg, N., and Alexander, R. W. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7180–7184
- Ferrari, S., and Thomas, G. (1994) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 385–413
- Stewart, M. J., and Thomas, G. (1994) *Bioessays* **16**, 809–815

CHAPITRE 3

DISCUSSION

DISCUSSION

L'hormone peptidique angiotensine II (AII), médiateur principal du système rénine-angiotensine, a été le sujet de nombreuses études ces dernières années étant donné son implication dans un grand nombre de processus biologiques importants pour la cellule {1,2}. Son implication, entre autre, dans le contrôle de la croissance des cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV) suggère un rôle dans certaines pathologies cardiovasculaires et en a fait un sujet d'étude très exploité. L' AII stimule la croissance de plusieurs types cellulaires tel que les CMLV {8,11,13,14}. Les différents effets de l'hormone dépendent de sa liaison à deux récepteurs spécifiques, nommés AT₁ et AT₂, qui appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G. Le sous-type AT₁ est responsable de la majorité des actions classiques de l'AII y compris son action trophique {1,7,21}. Les bases moléculaires des actions de l'AII demeurent encore très peu connues. La stimulation du récepteur AT₁ active plusieurs voies de signalisation telles que la PLC, la PLA₂, la PKC, la mobilisation du Ca²⁺, la phosphorylation de protéines en tyrosine, l'activation de protéines kinases telles que les MAP kinases et la p70^{S6K} ainsi que l'induction de proto-oncogènes.

Les facteurs de croissance sont impliqués au niveau du contrôle de la croissance et du développement cellulaire. La croissance et la division cellulaire sont étroitement liées au contrôle du taux de synthèse de protéines {109}. Au cours des dernières années, un bon nombre de connaissances ont été acquises au niveau du contrôle transcriptionnel de la cellule, alors que les voies de signalisation menant à la synthèse de protéines demeurent encore obscures. Les travaux présentés dans ce mémoire portent justement sur l'étude des voies de signalisation par lesquelles l'AII contrôle la synthèse de protéines.

Au niveau de la synthèse protéique, la traduction des ARNm peut se diviser en trois phases: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le site majeur de régulation est

l'étape d'initiation, qui est contrôlée par l'action d'un ensemble de facteurs d'initiation dont l'activité est réglée par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. L'étape limitante de l'initiation de la traduction est la liaison de l'ARNm au ribosome et demande la participation, entre autre, du complexe eIF4F qui est formé de trois sous-unités: eIF4A, eIF4E et eIF4G. Des perturbations qui surviennent à cette étape de la traduction peuvent affecter la croissance et le phénotype cellulaire {109}. Le contrôle et la régulation de ce processus sont donc très importants. Le facteur eIF4E est la composante la moins abondante de tous les eIF et représente par conséquent une cible très importante pour la régulation {32,183}. L'activité d'eIF4E est réglée positivement par phosphorylation et négativement par la liaison de protéines régulatrices nommées 4E-BP1 et 4E-BP2. Ces protéines récemment identifiées se lient spécifiquement à eIF4E et inhibent ainsi, réversiblement, la traduction coiffe-dépendante en empêchant la liaison entre les facteurs eIF4E et eIF4G qui ne peuvent donc pas former le complexe 4F fonctionnel lequel est nécessaire à l'initiation de la traduction. L'affinité de 4E-BP1 (homologue humain de PHAS-I de rat) pour eIF4E est diminuée suite à sa phosphorylation en réponse aux facteurs de croissance, hormones et mitogènes {98,119}, ce qui entraîne la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP1 et permet l'initiation de la traduction.

L'étude de la régulation de 4E-BP1 en réponse à l'AII dans les cellules musculaires lisses aortiques (CMLA) de rat (souche Brown-Norway) représentait donc un sujet très intéressant dans le but d'augmenter notre compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans l'action hypertrophique de l'AII. La caractérisation des mécanismes de régulation de l'activité de 4E-BP1 fut donc le sujet des travaux présentés dans ce mémoire. Plusieurs études avaient déjà été amorcées par d'autres équipes sur la régulation de PHAS-I en réponse à l'insuline et les résultats obtenus ont suscité notre intérêt. Tout d'abord, les équipes de Lin et de Pause {159,160} avaient rapporté que PHAS-I était phosphorylée sur un seul site, la sérine 64, en réponse à l'insuline et que cette phosphorylation était essentiellement induite par les MAP kinases. Suite à ces résultats fort attrayants, nous avons étudié les effets d'une

stimulation par l'AII sur la fonction de 4E-BP1 dans les CMLA, ce qui a conduit à la publication d'un premier manuscrit (voir chapitre 2: Manuscrit).

1. Régulation de 4E-BP1 (voir manuscrit):

La stimulation de cellules quiescentes avec l'AII induit un retard de migration électrophorétique de 4E-BP1, ce qui indique une augmentation de la phosphorylation de la protéine. Il est possible de distinguer trois bandes sur les autoradiogrammes des analyses d'immunobuvardage représentant 4E-BP1 phosphorylée à différentes stœchiométries. L'effet de l'AII est détectable après 5 minutes de stimulation mais atteint son maximum à 15 minutes et persiste pour au moins 120 minutes. Cette cinétique d'activation induite par l'AII ne correspond pas à celle des MAP kinases ERK1/ERK2, qui est monophasique, transitoire et atteint son maximum entre 1 à 5 minutes pour revenir presque au niveau de base après 15 minutes {10,40,73,80}. L'AII stimule la phosphorylation de 4E-BP1 de façon dépendante du temps et de la dose et ce, par l'activation du sous-type de récepteurs AT₁.

La phosphorylation de 4E-BP1 observée après le traitement des cellules par l'insuline ou par le sérum, est associée à une diminution de l'affinité de la protéine pour eIF4E {159,160,181}. Les analyses par chromatographie d'affinité utilisant une colonne de résine m⁷GTP-agarose (imitant la structure en coiffe de l'ARNm) nous ont permis de démontrer que dans les CMLA, la phosphorylation induite en réponse à l'AII occasionne une importante diminution de l'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E.

La caractérisation des sites de régulation de 4E-BP1 représentait l'étape subséquente de nos études. Pour ce faire, un marquage métabolique des cellules a été réalisé par l'incubation des cellules en présence d'acide phosphorique radioactif. Des analyses des acides aminés phosphorylés ont été réalisées et ont permis de déterminer que la stimulation des CMLA par l'AII résulte en une augmentation de la phosphorylation des résidus sérine et thréonine de 4E-BP1, sans aucune trace de phosphotyrosine. Les sites de phosphorylation de la protéine ont ensuite été analysés à l'aide de cartes

phosphopeptidiques en deux dimensions. Il est possible de distinguer sur les cartes réalisées à partir des cellules non-stimulées, la présence de trois peptides majeurs (3, 4, 5) et deux mineurs (1, 2). Suite au traitement des cellules pendant 15 minutes avec l'AII, le contenu en phosphate des cinq peptides déjà présents augmente à différents degrés et trois nouveaux peptides sont détectables (6, 7, 8). La plus forte augmentation est observée au niveau du peptide 1. Ces résultats viennent donc à l'encontre des observations initiales de Lin et al. {160} suggérant la phosphorylation de 4E-BP1 sur un seul site majeur.

Nous avons donc voulu vérifier l'implication des MAP kinases dans la phosphorylation de 4E-BP1, puisque l'AII stimule fortement l'activité ERK1/2 dans les CMLA. Tel que mentionné précédemment, la cinétique d'activation de ERK1/2 en réponse à l'AII ne correspond pas à celle de 4E-BP1. L'étude des cartes peptidiques des sites phosphorylés par ERK1 *in vitro* a démontré que 4E-BP1 est un bon substrat pour ERK1 mais qu'un seul site majeur (possiblement la sérine 64) est phosphorylé comparativement à huit dans les analyses *in vivo* de cellules stimulées. Ce site de phosphorylation pourrait correspondre au peptide 1 des cartes peptidiques *in vivo* tel que déterminé par des études de co-migration (résultats non publiés). Comme le contenu en phosphate de ce site n'est pas augmenté significativement après 5 minutes de stimulation (temps auquel l'activité des MAP kinases est maximale), l'implication d'ERK1/2 dans la phosphorylation de 4E-BP1 est douteuse. Finalement, le traitement des cellules avec l'inhibiteur pharmacologique de MEK, le PD98059 {79}, n'a eu aucun effet sur la phosphorylation de 4E-BP1. Donc la combinaison de résultats d'études cinétiques, d'analyses de phosphopeptides *in vitro* et *in vivo* et d'études pharmacologiques suggère fortement que les MAP kinases ERK1/ERK2 ne sont pas impliquées dans la régulation de la phosphorylation de 4E-BP1. Nos résultats démontrent donc que le traitement des CMLA induit une hyperphosphorylation du régulateur traductionnel 4E-BP1 ainsi que sa dissociation d'eIF4E selon un mécanisme MAPK-indépendant et que cette phosphorylation diminue l'affinité de 4E-BP1 envers eIF4E.

Les résultats obtenus lors de la première partie des travaux définissent un nouveau mécanisme par lequel l'AII exerce ses effets trophiques sur les cellules cibles, en agissant sur la régulation de composantes importantes de la machinerie traductionnelle qui mènent à une augmentation du taux global de la synthèse de protéines. Il existe donc de plus en plus d'évidences qui confèrent un rôle direct à l'AII dans la régulation de la traduction, que ce soit par la phosphorylation de 4E-BP1 tel que démontré par ces travaux, ou encore par la stimulation de la phosphorylation du facteur d'initiation eIF4E dans les CMLA {143}. En effet, il existe une bonne corrélation entre l'état de phosphorylation de eIF4E et le taux de synthèse protéique dans les cellules. L'AII peut également stimuler la traduction en induisant la phosphorylation de la protéine S6 de la sous-unité ribosomale 40S via l'activation de la $p70^{S6K}$ {10}.

2. Voies de signalisation de 4E-BP1:

Les voies de signalisation qui relient les récepteurs AT_1 à la phosphorylation de 4E-BP1 doivent être éclaircies et l'utilisation de composés pharmacologiques agissant au niveau de différentes voies métaboliques représentent une approche initiale valable. La protéine PHAS-I de rat possède de nombreux sites consensus de phosphorylation. En plus des sept sites potentiels de phosphorylation par les MAP kinases, elle contient des sites pour la PKC {169} et la caséine kinase II (CKII) {170}. Il est donc important d'arriver à caractériser le rôle de chaque voie potentiellement impliquée dans la régulation de 4E-BP1. A cette étape, nous ne pouvons exclure également la possibilité que la phosphorylation de 4E-BP1 soit une conséquence de l'inhibition d'une sérine/thréonine phosphatase par l'AII.

De récentes études suggèrent que la $p70^{S6K}$ pourrait être impliquée dans les effets d'hormones telle que l'insuline sur les mécanismes de traduction, par la phosphorylation multiple de la protéine S6 et aussi 4E-BP1 {184}. La phosphorylation et la stimulation de la $p70^{S6K}$ induites par des mitogènes semblent également jouer un rôle important dans la phase G1 du cycle cellulaire qui nécessite une augmentation de la synthèse de protéines. Il a été démontré que la rapamycine

inhibe l'activation de la p70^{S6K} et diminue la phosphorylation de 4E-BP1 et de la protéine S6 {184}. Il est donc possible qu'une voie de signalisation sensible à la rapamycine soit responsable de la phosphorylation de 4E-BP1 {193,196}. Le mécanisme par lequel le composé immunosuppresseur rapamycine inhibe l'activité de la p70^{S6K} n'est pas direct. La rapamycine forme un complexe avec l'immunophiline FKBP12 (*FK506-binding proteins*) ce qui permet une amplification de ses fonctions. Le complexe se lie ensuite à une protéine de haut poids moléculaire nommée mTOR. Cette protéine fait partie de la famille des kinases reliées aux phosphoinositide 3-kinases (*phosphoinositide-3-kinase-related kinases*) {185}. En se basant sur les similarités structurelles, mTOR a été caractérisée aussi bien comme une lipide kinase qu'une protéine kinase {193,196}. Il a été proposé que mTOR se trouvait en amont de la voie de signalisation de la p70^{S6K}. La figure 1 schématise de façon simplifiée les voies de signalisation impliquant la p70^{S6K} {186}.

La rapamycine inhibe donc la phosphorylation de 4E-BP1, ce qui est suivi, plus lentement toutefois, par une suppression partielle de la traduction coiffe-dépendante {184}. La phosphorylation de 4E-BP1 serait donc modulée par la même voie de signalisation qui est responsable de la phosphorylation et de l'activation de la p70^{S6K} et, par conséquent, de la protéine ribosomale S6. La première hypothèse proposée par le groupe de von Manteuffel et coll. {184}, proposait que la phosphorylation de 4E-BP1 était modulée directement par la p70^{S6K}. Ceci est improbable puisque 4E-BP1 ne possède pas de site consensus de reconnaissance pour la p70^{S6K} et n'est pas un substrat pour la protéine kinase *in vitro* {184}. Par contre, la p70^{S6K} pourrait agir en amont d'une kinase de 4E-BP1. La seconde hypothèse avancée par le groupe de von Manteuffel proposait une bifurcation possible en aval de la protéine mTOR dans une voie de signalisation qui serait parallèle, mais modulerait de façon distincte, la phosphorylation de 4E-BP1 et l'activation de la p70^{S6K}. Cette hypothèse est fort probable puisque, entre autre, une forme mutante de la p70^{S6K} insensible à la rapamycine est incapable de protéger 4E-BP1 de l'inhibition de phosphorylation induite par la rapamycine comme elle le fait pour la protéine S6 ribosomale {184}.

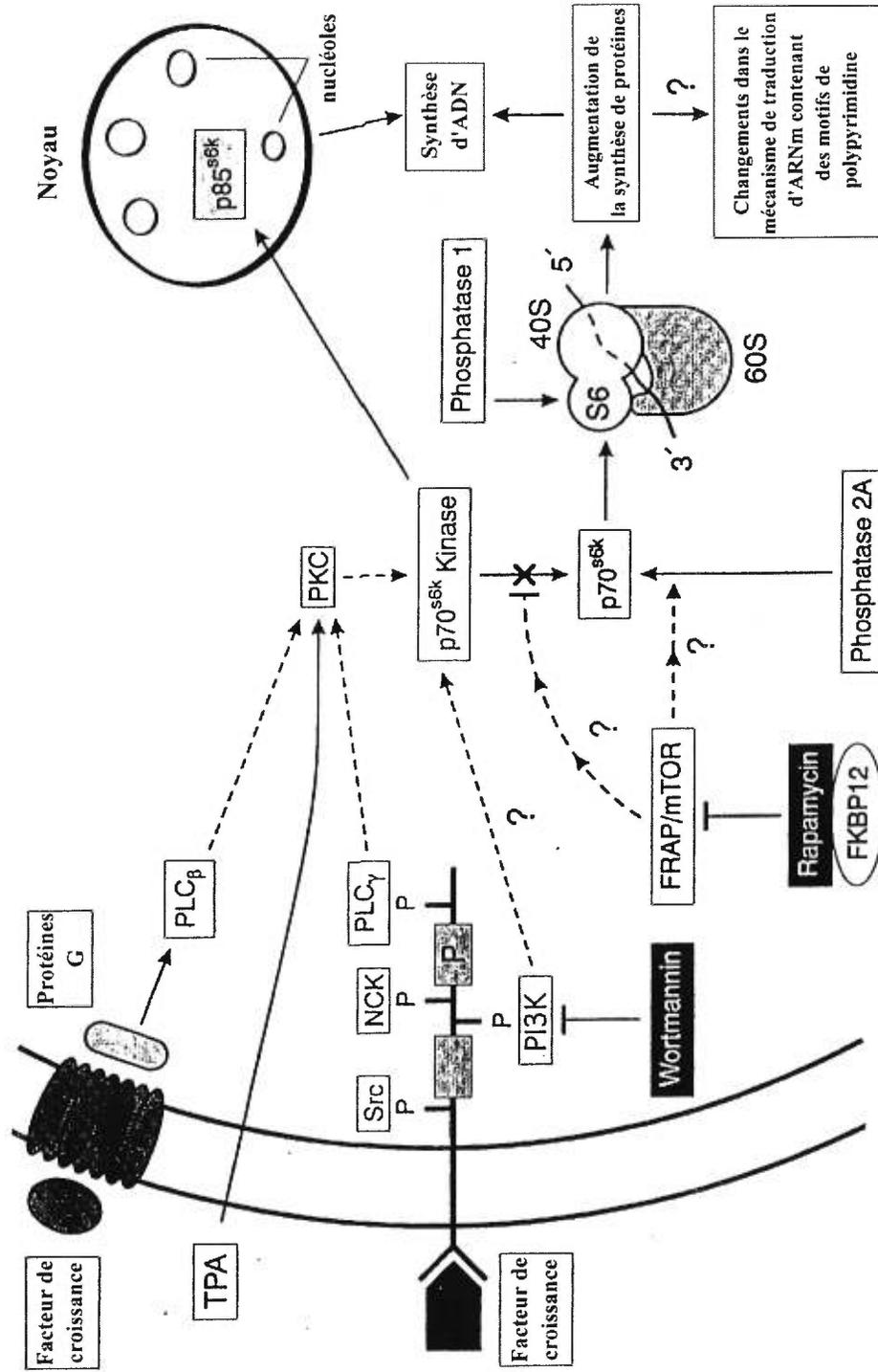


Figure 1: Représentation schématique des voies de signalisation de la p70^{S6K} et de la p85^{S6K}.

Schéma adapté de Ferrari et Thomas, 1994 {186}.

Selon les résultats de cette équipe, la voie de signalisation menant à la phosphorylation de la p70^{S6K} et de 4E-BP1 semble bifurquer immédiatement avant la p70^{S6K}. Il y aurait donc, selon ces résultats, un activateur commun en amont de la protéine p70^{S6K} qui modulerait les signaux conduisant à l'activation de cette kinase et de 4E-BP1, qui sont toutes deux sensibles à la rapamycine. La protéine mTOR représente un bon candidat pour cet activateur commun puisqu'elle est une cible d'inhibition de la rapamycine. Il a été clairement démontré que la protéine mTOR se trouve en amont de la p70^{S6K} puisqu'une forme mutante de mTOR résistante à la rapamycine est en mesure de protéger la p70^{S6K} de l'inactivation causée par cet inhibiteur. Il a d'ailleurs été montré récemment par Sabatini et Snyder, que mTOR phosphorylerait p70^{S6K} {187}.

Des études montrent que mTOR est capable de phosphoryler PHAS-I en réponse à l'insuline *in vitro* et *in vivo* dans des cellules embryonnaires humaines de reins (HEK 293). Cette phosphorylation est inhibée suite au traitement des cellules par la rapamycine et la wortmannine {185}. La wortmannine inhibe irréversiblement l'autophosphorylation de mTOR *in vitro* en ciblant le site de liaison de l'ATP sur la protéine mTOR, ce qui semble inactiver le domaine kinase de la protéine et par conséquent son activité kinase {185}. La protéine mTOR n'est peut être pas la seule cible sensible à la rapamycine et à la wortmannine dans les voies de signalisation menant à la phosphorylation de PHAS-I, mais ces observations indiquent que l'activité phosphotransférase de mTOR est importante pour la signalisation à travers cette voie

3. Analyses des voies de signalisation impliquées dans la régulation de 4E-BP1 dans les CMLA:

A la lumière des résultats suggérant que les MAP kinases ne seraient pas impliquées dans la phosphorylation de 4E-BP1 (ref. manuscrit), nous avons poursuivi nos études à l'aide de divers inhibiteurs pharmacologiques capable de bloquer différentes voies de signalisation cellulaire. Le but de cette seconde partie du travail était de tenter d'identifier la ou les voies de signalisation responsables de la phosphorylation de 4E-BP1 induite par l'AII dans les CMLA. La figure 2 résume les résultats obtenus sur la

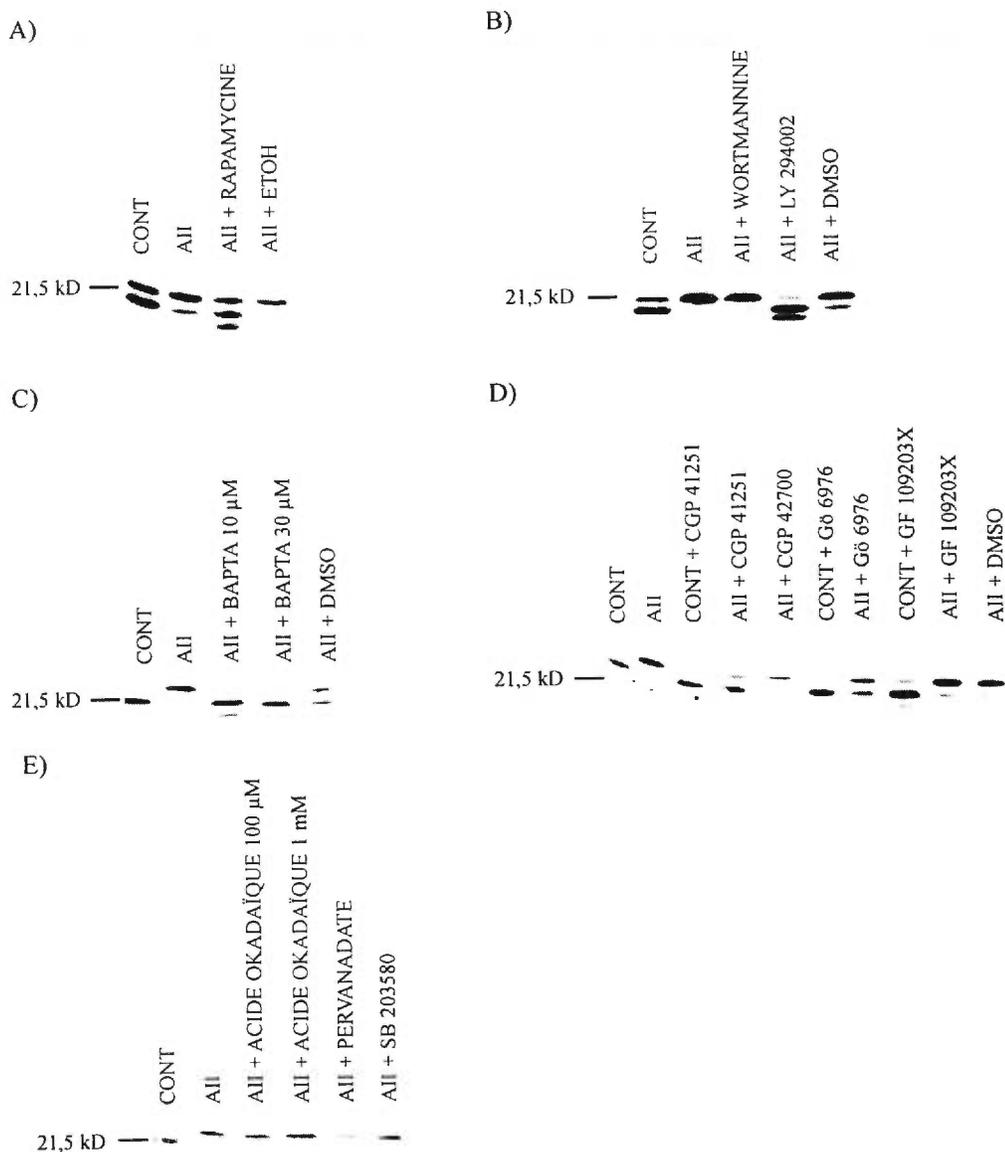


Figure 2: Effets d'inhibiteurs pharmacologiques agissant au niveau des voies de signalisation de la $p70^{S6K}$ (A) et de la PI3K (B), du Ca^{2+} (C), de la PKC (D) et des phosphatases et de la MAPK p38 (E) sur la phosphorylation de 4E-BP1 stimulée par l'AII dans les CMLA.

Les CMLA de rats ont été amenés à quiescence par une incubation de 48 h dans un milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été pré-traitées pour 30 min avec le véhicule seul (DMSO ou ETOH selon le cas) ou avec 10 ng/ml de rapamycine (A), 100nM de wortmannine ou 50 μ M de LY 294002 (B), 10 ou 30 μ M de BAPTA-AM (C), 1 μ M de CGP 41251, de CGP 42700, de Gø 6976 ou de GF109203X (D) ou encore 100 μ M ou 1mM d'acide okadaïque, 100 μ M de pervanadate ou 10 μ M de SB 203580 (E).

Les cellules étaient ensuite stimulées ou non (CONT) avec 100 nM d'AII pour 15 min et lysées par des cycles répétés de congélation et décongélation. Des quantités égales de protéines ont été traitées à 95°C et les protéines solubles à la chaleur ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur gel 15% et transférées sur membrane de nitrocellulose. Un sérum anti-4E-BP1 (11208) a été utilisé pour sonder les membranes et les protéines ont été détectées par chemiluminescence.

phosphorylation de 4E-BP1 suite au traitement des CMLA avec divers agents pharmacologiques.

Comme d'autres équipes l'ont également observé, la rapamycine inhibe partiellement la phosphorylation de 4E-BP1 en réponse à l'AII (figure 2, panneau A), ce qui suggère fortement l'implication d'une voie sensible à la rapamycine dans la régulation de 4E-BP1 {151,160,181,182}. Ce résultat est cohérent avec les observations faites précédemment dans le laboratoire qui montrent que le composé immunosuppresseur inhibe 60 à 80% de la synthèse de protéines induite par l'AII dans les CMLA {10}. L'activation de la PI3K est impliquée dans la voie de signalisation de la p70^{S6K} (voir figure 1). Plusieurs protéines sérine/thréonine kinases telles que AKT (aussi appelée protéine kinase B) et certaines isoformes de la PKC sont situées en aval de la PI3K dans cette voie métabolique {87}. L'antibiotique wortmannine et le composé LY294002 sont deux composés avec des structures différentes et des modes d'action distincts, qui inhibent l'activation de la PI3K et par conséquent l'activation des substrats en aval de cette kinase. La figure 2B montre que le LY294002, qui agit au niveau de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, inhibe de façon drastique la phosphorylation de 4E-BP1 en réponse à l'AII dans les CMLA. On observe une disparition presque complète de la forme hyperphosphorylée (γ) de la protéine et la nette apparition de la forme non-phosphorylée (α). La wortmannine a peu d'effet inhibiteur, contrairement à ce qui a été démontré dans les cellules embryonnaires humaines de rein (HEK 293) au niveau de la phosphorylation de PHAS-I. Cette différence d'action pourrait être attribuable, entre autre, au fait que dans les CMLA, ces deux composés ciblent probablement différentes isoformes de la PI3K. De récentes études ont mis en doute la spécificité de la wortmannine comme inhibiteur de la PI3K, puisque ce composé inhiberait également la PLA₂, la PLD et la PLC dans les cellules Swiss 3T3. De plus, la wortmannine serait un inhibiteur plus puissant de la PLA₂ que de la PI3K {188}. Une variation dans la perméabilité membranaire de ces composés dans les différents types cellulaires peut également expliquer les divergences de réactivité. L'inhibition par le LY294002 indiquerait donc que la voie de la PI3K semble impliquée dans la phosphorylation de 4E-BP1. Il est possible qu'une des

kinases en aval de la PI3K, telles que la PKC ou AKT, soit responsable de la phosphorylation de 4E-BP1.

Le calcium étant un élément important du métabolisme cellulaire, nous avons étudié les effets d'un agent chélatant le calcium, le BAPTA-AM, sur la phosphorylation de 4E-BP1. Une inhibition très claire de la phosphorylation de 4E-BP1 en réponse à l'AII est observée et identifiée par la disparition de la forme hyperphosphorylée (γ) de la protéine et une légère apparition de la forme non-phosphorylée (figure 2, panneau C). Il est cependant difficile de conclure sur l'importance du calcium au niveau de la phosphorylation de 4E-BP1 en se basant sur les résultats obtenus avec le BAPTA-AM, puisque ce composé chélate tout le calcium intracellulaire y compris celui présent dans la cellule au repos. L'utilisation d'un bloqueur de la Ca^{2+} ATPase du réticulum endoplasmique, comme la thapsigangine, qui capture le Ca^{2+} relâché des pools intracellulaires, permettrait de mieux évaluer l'importance de cet élément dans la phosphorylation de 4E-BP1.

La protéine 4E-BP1 contient des sites potentiels de phosphorylation par la PKC et l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des PKC permet de suggérer l'implication de cette kinase dans la régulation de 4E-BP1. Le panneau D de la figure 2 illustre les résultats obtenus avec le CGP 41251, un inhibiteur non-sélectif des isoformes de PKC, qui bloque la phosphorylation de 4E-BP1. Le CGP42700, un contrôleur négatif qui n'affecte pas l'action des PKC, n'a eu aucun effet sur la phosphorylation de la protéine. Le composé Gö6976, un inhibiteur sélectif des isoformes de PKC dépendantes du calcium, semble avoir un léger effet sur la phosphorylation de 4E-BP1. La forme phosphorylée (β) de la protéine apparaît d'intensité similaire à celle du témoin alors qu'elle n'est pas présente lors de la stimulation par l'AII. Ces derniers résultats sont cohérents avec l'inhibition de la phosphorylation observée lors de la chélation du calcium intracellulaire. Le composé GF109203X, qui inhibe certains isoformes de la PKC, ne semble pas avoir beaucoup d'effet sur la phosphorylation de 4E-BP1. La PKC pourrait être également impliquée dans la régulation de la

phosphorylation de 4E-BP1, ce qui rejoint les résultats obtenus avec les inhibiteurs de la PI3K.

L'hypothèse que la phosphorylation de 4E-BP1 pouvait dépendre de l'inactivation d'une ou de plusieurs phosphatase(s) a été étudiée à l'aide de composés inhibiteurs de protéines phosphatases. L'acide okadaïque bloque sélectivement l'action de certaines sérine/thréonine phosphatases, alors que le pervanadate agit au niveau des tyrosine phosphatases. Ces deux composés pharmacologiques n'ont eu aucun effet sur la phosphorylation de 4E-BP1 (figure 2E). La régulation de cette protéine ne semble donc pas dépendre de l'action des phosphatases sensibles à ces inhibiteurs..

La protéine p38/RK fait partie de la famille des MAP kinases qui sont activées par le stress. Le composé SB203580 inhibe l'activité de cette protéine kinase de façon très sélective. La phosphorylation de 4E-BP1 n'est pas affectée par l'inhibition de la p38 (figure 2E). D'autres équipes ont par contre observé que PHAS-I était phosphorylée par p38 dans les cellules HEK 293 et que cette phosphorylation se trouvait bloquée par le SB203580 [185]. La différence de type cellulaire est de nouveau à considérer en ce qui concerne les différences observées au niveau des cellules cibles.

Grâce à une approche pharmacologique utilisant différents composés agissant au niveau de diverses voies de signalisation, nous avons pu observer que la phosphorylation du répresseur de traduction 4E-BP1 semblait être réglée par une ou plusieurs voies sensibles à la rapamycine et à la chélation du calcium, impliquant la PI3K et/ou la PKC.

Le panneau A de la figure 3 montre de nouveau l'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1 par les différents inhibiteurs utilisés. Comme il a été mentionné auparavant, la phosphorylation de 4E-BP1 occasionne la dissociation du complexe eIF4E/4E-BP1. Nous avons donc utilisé la technique de chromatographie d'affinité avec une colonne de m⁷GTP-agarose qui imite la structure en coiffe de l'ARNm pour vérifier les effets

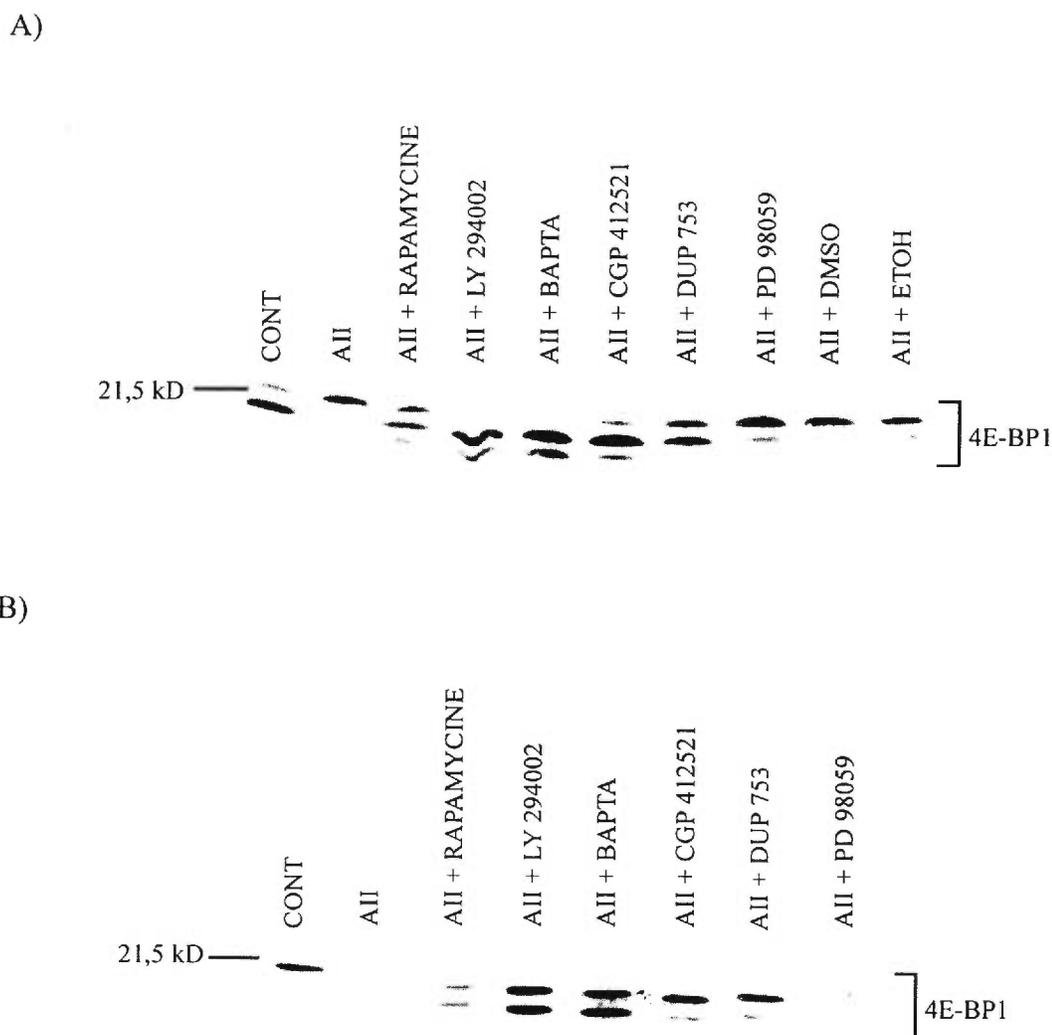


Figure 3: Effets d'inhibiteurs pharmacologiques de différentes voies de signalisation et d'antagonistes AT_1 sur la phosphorylation de 4E-BP1 stimulée par l'AII (A) et sur l'association entre 4E-BP1 et eIF4E (B) dans les CMLA de rats.

Les cellules quiescentes ont été pré-traitées 30 min avec le véhicule seul (DMSO ou ETOH) ou, selon le cas, 60 min avec 10ng/ml de rapamycine, 30 min avec 50 μ M de LY 294002, 30 μ M de BAPTA-AM, 10 μ M de CGP 41251, 10 μ M de DUP 753 ou 30 μ M de PD 98059.

A) Les cellules étaient stimulées ou non (CONT) avec 100 nM d'AII pour 15 min. Les protéines solubles à la chaleur ont été extraites et la phosphorylation de 4E-BP1 a été analysée par immunobuvardage tel que décrit à la figure 2.

B) Les cellules étaient stimulées ou non (CONT) avec 100 nM d'AII pour 15 min. Les lysats cellulaires ont été préparés et incubés avec des billes de m^7 GTP-agarose pour 30 min à 25°C. Après lavage, les protéines étaient éluées dans le tampon d'échantillon de Laemmli, séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur gel 15% et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Un sérum anti-4E-BP1 (11208) a été utilisé pour sonder la membrane. Les protéines ont été visualisées par détection par chemiluminescence.

des composés affectant la phosphorylation de 4E-BP1 sur son affinité envers eIF4E. Les formes non-phosphorylée et hypo-phosphorylées de la protéine 4E-BP1 s'attache à eIF4E et demeure donc liée à la colonne alors que les formes hyperphosphorylées sont relâchées. Le panneau B de la figure 3 indique que lorsque les cellules sont traitées avec les agents pharmacologiques qui bloquent la phosphorylation de 4E-BP1 ou encore avec un antagoniste des récepteurs AT₁ (DUP 753 ou losartan), l'affinité de la protéine pour eIF4E augmente, ce qui permet son association à la colonne et son identification par immunobuvardage. L'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1 par les inhibiteurs de la voie p70^{S6K}, de la voie PI3K, de la PKC et par le chélateur de calcium ont tous favorisé l'association du complexe eIF4E/4E-BP1. Il est important de noter que la liaison d'eIF4E à la colonne m⁷GTP-agarose n'est nullement affectée par le traitement des cellules par l'AII ou encore par les composés utilisés. Ce maintien de la liaison de eIF4E à la colonne est le reflet du processus métabolique de l'initiation de la traduction puisque la liaison d'eIF4E à la coiffe de l'ARNm n'est pas affectée par la stimulation des cellules par l'AII ou autres composés utilisés lors de cette étude. Il est intéressant de noter que plus l'inhibition de la phosphorylation est claire et marquée, plus l'affinité de 4E-BP1 envers eIF4E semble augmenter. Les bandes correspondant à 4E-BP1 sont beaucoup plus marquées pour les conditions avec le BAPTA-AM et le LY294002 qui ont fortement affecté la phosphorylation de 4E-BP1.

Dans le but de poursuivre les études pour déterminer la localisation des sites régulateurs de la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLA et d'identifier les voies de signalisation menant à l'augmentation de cette phosphorylation, des analyses de cartes phosphopeptidiques ont été réalisées sur les cellules après un traitement avec les divers inhibiteurs. L'objectif de ces expériences, illustrées à la figure 4, était de déterminer la présence d'un ou de plusieurs sites de phosphorylation affectés par les différents traitements. Le panneau A montre l'inhibition de phosphorylation de 4E-BP1 par la rapamycine et le LY294002. Le composé Gö 6976 n'affecte pas aussi fortement la phosphorylation de 4E-BP1 que les deux autres composés précédents,

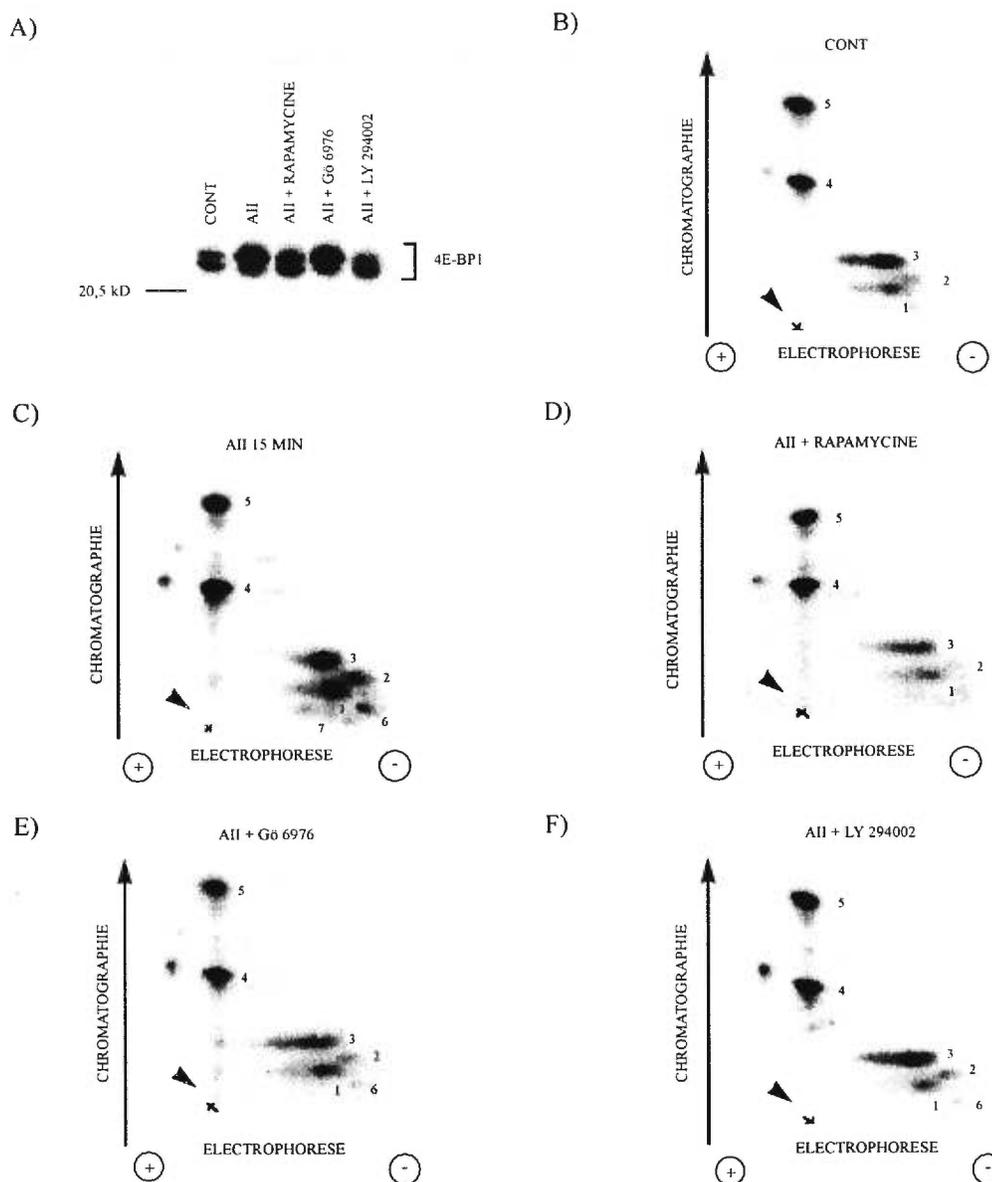


Figure 4 : Effets d'inhibiteurs de différentes voies de signalisation sur les cartes phosphopeptidiques de 4E-BP1 stimulées par l'AII dans les CMLA.

Les cellules quiescentes ont été marquées pendant 5 h avec de l'acide phosphorique [^{32}P]. Les cellules ont été ensuite pré-traitées 30 min avec, selon le cas, 10 ng/ml de rapamycine, 1 μM de Gö6976 et 50 μM de Ly 294002 avant la stimulation ou non (CONT) de 15 min avec 100 nM d'AII. Les cellules ont été lysées et 4E-BP1 a été immunoprécipité en utilisant l'anti-sérum 11208 pré-adsorbé sur des billes de protéine A-Sépharose. Après le lavage des billes, les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de 15% et transférées sur une membrane de PVDF avant l'autoradiographie. La position de 4E-BP1 est indiquée.

Autoradiogramme de la membrane (A). Les bandes de la protéine 4E-BP1 marquées au [^{32}P] ont été coupées et digérées avec la trypsine. Les phosphopeptides ont été séparés par électrophorèse sur couche mince suivi d'une chromatographie ascendante. Les phosphopeptides majeurs ont été identifiés de 1 à 7. La flèche indique l'endroit du dépôt de l'échantillon. La quantité de radioactivité déposée sur les plaques était de : B) CONT : 340 cpm, C) AII : 915 cpm, D) RAPAMYCINE : 770 cpm, E) Gö6976 : 990 cpm et F) LY 294002 : 510 cpm.

mais un effet significatif est observable. On remarque une augmentation d'intensité des sites de phosphorylation numérotés 1 à 5 entre les conditions contrôle en B et stimulée 15 minutes avec l'AII (panneau C), en plus de l'apparition de 2 nouveaux peptides numérotés 6 et 7.

L'augmentation de phosphorylation la plus appréciable se produit au niveau des peptides 1 et 2. Après un traitement avec la rapamycine, les sites de phosphorylation 1, 2 et 3 diminuent fortement alors que les sites 6 et 7 disparaissent complètement. La plus forte baisse relative de signal semble se produire au niveau des peptides 1 et 2. Le composé Gö6976 cause également une diminution de la phosphorylation de tous les peptides, mais plus particulièrement au niveau du peptide 2. Le peptide 7 disparaît également alors que l'intensité du peptide 6 diminue significativement. Le composé LY294002 a un effet général sur tous les sites de phosphorylation, quoique moins marqué au niveau des sites 3, 4 et 5. Le peptide 7 n'apparaît plus après le traitement et les sites 1, 2 et 6 sont les plus affectés.

A la suite de l'analyse de ces résultats, nous observons que les différents agents utilisés n'affectent pas la phosphorylation de 4E-BP1 de la même façon et avec la même intensité. Le site 3 semble diminuer de façon appréciable en présence de rapamycine, tandis qu'il est moins affecté par le traitement avec le LY294002. Ceci suggère que les divers agents inhibiteurs utilisés cibleraient différents sites de phosphorylation de 4E-BP1. Ainsi, le peptide 3 pourrait représenter une cible pour les inhibiteurs de la $p70^{S6K}$, alors qu'il serait moins sensible à la voie de signalisation de la PI3K inhibée par le LY294002. Ces observations indiquent qu'il existerait plusieurs voies menant à la phosphorylation de 4E-BP1 et que chacune fonctionnerait de façon parallèle avec certains sites de phosphorylation cibles spécifiques à chaque voie. Les sites de phosphorylation semblent être divisés en deux groupes tel que rapporté par von Manteuffel et coll. {184}. Un premier ensemble (sites 4 et 5 sur la figure 4) est hautement phosphorylé en absence de stimulation et n'est pas sujet à une forte augmentation d'intensité lors de la stimulation par l'AII. Ces sites pourraient représenter la phosphorylation basale de la protéine 4E-BP1, indiquant qu'une kinase

insensible aux inhibiteurs utilisés phosphoryle 4E-BP1 de façon constitutive. Il est également possible de remarquer sur les autoradiogrammes des analyses d'immunobuvardage de 4E-BP1 que la forme phosphorylée (β) de la protéine, parfois accompagnée de la forme non-phosphorylée (α), apparaît toujours dans les conditions où les cellules sont au repos, ce qui vient appuyer l'hypothèse d'une phosphorylation basale. Un second ensemble de sites de phosphorylation est caractérisé par une forte augmentation de l'intensité de marquage suite à la stimulation par l'AII. Ces résultats semblent de nouveau indiquer que plusieurs voies parallèles sont impliquées dans la régulation de la phosphorylation de 4E-BP1. Ces dernières expériences représentent des études préliminaires, de plus amples investigations devront être effectuées en utilisant tous les agents pharmacologiques ayant démontrés un effet quelconque sur la phosphorylation de 4E-BP1.

Ces résultats sont cohérents avec les récentes études qui proposent que la protéine mTOR est un bon candidat pour être la kinase de 4E-BP1 {193,196}. Toutefois, aucun des sites de phosphorylation n'est complètement inhibé par la rapamycine. Cet agent immunosuppresseur abolit l'autophosphorylation de mTOR et devrait par conséquent abolir la capacité de cette kinase de phosphoryler les cibles en aval. Cette observation suggère deux hypothèses {184} : tout d'abord que mTOR ne soit pas une kinase de 4E-BP1 ou alors que d'autres protéines kinases sont également capables de phosphoryler la protéine.

Le groupe de Brunn {185} publiait récemment que mTOR était capable de phosphoryler PHAS-I *in vitro* et *in vivo* en réponse à l'insuline dans les cellules HEK 293 et que cette phosphorylation diminuait sensiblement l'affinité de liaison entre PHAS-I et eIF4E. Les deux événements étaient été bloqués par le complexe FKBP12-rapamycine. L'inhibition de l'activité PHAS-I kinase de mTOR pourrait être le mécanisme par lequel la rapamycine interfère dans la progression de la phase G1 et l'engagement au niveau de la phase S du cycle cellulaire {185}.

4. Conclusions et perspectives:

La combinaison des résultats obtenus par notre laboratoire avec ceux d'autres équipes nous permettent de démystifier d'avantage les mécanismes impliqués dans la transmission du signal qui mènent à l'augmentation de la synthèse de protéines. La régulation de la phosphorylation du facteur répresseur de la traduction 4E-BP1 s'avère beaucoup plus complexe que ce qui avait été originalement proposé.

Une régulation de la phosphorylation de 4E-BP1 par plusieurs voies de signalisation

A la lumière des résultats observés, la phosphorylation de 4E-BP1 paraît être soumise à une régulation par plusieurs voies de signalisation qui pourraient agir en parallèle ou de façon concertée. Une des premières hypothèses avancées concernant l'identité de ces voies, serait l'implication d'une voie de signalisation sensible à la rapamycine dont la protéine mTOR agirait comme effecteur. La PI3K représente une seconde hypothèse dans l'identification des voies de signalisation menant à la phosphorylation de 4E-BP1. Les substrats situés en aval de la PI3K qui sont connus à ce jour, tels que la protéine kinase AKT et certaines isoformes de la PKC, pourraient conséquemment représenter des candidats potentiels pour une kinase de 4E-BP1. Il est également important de tenir compte du rôle du calcium dans la régulation des fonctions de 4E-BP1. La protéine kinase responsable de la phosphorylation de 4E-BP1 pourrait être dépendante du calcium ou encore voir son activité augmenter en présence de cet élément intracellulaire. Cette caractéristique particulière pourrait servir d'outil à l'identification de l'activateur de 4E-BP1.

Identification de la séquence des sites de phosphorylation de 4E-BP1

Pour faciliter l'identification des voies de signalisation impliquées dans la fonction de 4E-BP1, il serait important de cartographier et de séquencer les sites de phosphorylation de 4E-BP1 *in vivo* dans le but de déterminer la ou les kinases qui en sont responsables. Des expériences ont été initiées dans le but de séquencer les sites

observés lors des analyses de cartes phosphopeptidiques des CMLA suite à la stimulation par l'AII. Une autre équipe a identifié chez PHAS-I, dans les adipocytes de rats, cinq sites phosphorylés par la MAP kinase ERK *in vitro* et les ont identifiés comme étant Thr³⁶, Thr⁴⁵, Ser⁶⁴, Thr⁶⁹, Ser⁸² {189}. Ces résultats sont possiblement différents de ce qui pourra être observé dans les CMLA puisque ERK1/2 ne phosphoryle qu'un seul site dans ces cellules, qui pourrait cependant correspondre à la sérine 64.

Utilisation d'approches génétiques et pharmacologiques pour l'identification de la ou des kinases de 4E-BP1

L'utilisation d'approches génétiques combinée aux études pharmacologiques peut servir à l'identification de la ou des kinases de 4E-BP1. Suite à l'identification de la séquence des sites phosphorylés en réponse à l'AII, divers composés pharmacologiques, inhibiteur ou activateur des voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation de 4E-BP1, pourraient être utilisés pour bien déterminer la contribution relative de chaque voie. De plus, l'expression de mutants de ces sites de phosphorylation permettrait, suite au traitement des cellules avec les composés modulant la fonction de 4E-BP1, d'associer la voie de signalisation correspondant au site ayant subi une mutation. Ceci pourrait être réalisé en comparant les cartes phosphopeptidiques de la protéine 4E-BP1 non-mutée aux cartes produites en présence des différents inhibiteurs pharmacologiques ainsi qu'aux cartes correspondant aux différentes mutations. Une fois la ou les voies de signalisation identifiée(s), il pourrait être intéressant d'exprimer un mutant de la kinase soupçonnée d'être responsable de la phosphorylation de 4E-BP1 et ainsi de vérifier l'importance de son rôle dans la régulation de la protéine. De plus, il serait intéressant de tenter de déterminer l'importance relative de tous les sites phosphorylés *in vivo* dans la fonction principale de 4E-BP1, c'est-à-dire son association avec eIF4E. En introduisant des mutations au niveau des sites de phosphorylation observés, il serait être possible de déterminer l'importance de chacun et par conséquent, de leur phosphorylation respective au niveau de la fonction de 4E-BP1 dans l'initiation de la traduction dans

les CMLA. Il existe possiblement une phosphorylation présente de façon basale dans la cellule, indiquant un rôle mineur dans la traduction, pour la voie métabolique qui en est responsable, puisque la modification de ce ou ces sites n'affecterait possiblement pas la liaison de 4E-BP1 à eIF4E.

Les travaux effectués au cours de ce projet de maîtrise ont donné naissance à des résultats qui ont favorisé l'avancement de nos connaissances au niveau des voies métaboliques reliant le récepteur AT₁ des CMLV à l'action hypertrophique de l'AII et plus particulièrement au niveau de la synthèse de protéines. Ces expériences ont permis de déterminer que l'AII induit une hyperphosphorylation du répresseur de la traduction 4E-BP1 sur au moins huit résidus sérine/thréonine selon un mécanisme indépendant des MAP kinases, ce qui réduit son affinité pour eIF4E. L'hypothèse suggérant que la régulation de cette phosphorylation soit attribuable à plusieurs voies de signalisation fonctionnant en parallèle se veut une des plus probables. Parmi les différentes possibilités, on retrouve une voie sensible au composé immunosuppresseur rapamycine impliquant probablement la protéine mTOR comme principal effecteur, une seconde voie associée à la PI3K ou encore à la PKC. Ces deux dernières pourraient être reliées puisque la protéine kinase C est une cible située en aval de la PI3K en plus de AKT qui se veut également un candidat potentiel comme kinase de 4E-BP1. Le calcium semble également être un élément important dans la régulation de la phosphorylation de la protéine.

Bien que certains inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation tels que ceux utilisés au cours de ces travaux ont apporté des informations importantes dans la découverte de cibles potentielles de régulation, les études futures demanderont des outils plus précis et sélectifs tels que les approches génétiques proposées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Chassagne, C., Servant, M.J., Meloche, S. Récepteur de l'angiotensine II: rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal. *Médecine Science* 1996; **12**: 1351-1359.
2. Brooks, D.P., Ruffolo, R.R.J. Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. Dans: *Angiotensin II Receptors. Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology and Clinical Perspectives*. Édité par : Ruffolo R.R.Jr, Boca Raton: CRC Press Inc. 1994; 71-102.
3. Higashimori, K., Gante, J., Inagami, T. Significance of vascular renin for local generation of angiotensins. *Hypertension* 1991; **17**: 270-277.
4. Johnston, C.I. Renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J Hypertens* 1992; **10**: S13-S26.
5. Catt, K.J., Sandberg, K., Balla, T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. Dans: *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. Édité par : Raizada, M.K., Phillips, M.I., Summers, C.E, Boca Raton: CRC Press Inc. 1993; 307-356.
6. Goodfriend, T., Elliott, M.E., Catt, K.J. Angiotensin receptors and their antagonists. *The New England Journal of Medicine* 1996; **334**: 1649-1654.
7. Regitz-Zagrosek, V., Neub, M., Holzmeister, J., Warnecke, C., Fleck, E. Molecular biology of angiotensin receptors and their role in human cardiovascular disease. *J Mol Med* 1996; **74**: 233-251.
8. Pratt, R.E., Dzau, V.J. Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system. Dans: *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. Édité par: Raizada, M.K., Phillips, M.I., Summers, C.E. Boca Raton: CRC Press Inc. 1993; 471-483.
9. De Gasparo, M., Levens, N.R., Kamber, B.E. The angiotensin II AT₂ receptor subtype. Dans: *Angiotensin receptors*. Édité par: Saavedra, J.M., Timmermans, P.B.M.W.M. .New York: Plenum Press, 1994; 95-117.
10. Giasson, E., Meloche, S.. Role of p70 S6 protein kinase in angotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5225-5231.
11. Berk, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M., Tsuda, T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989; **12**: 305-314.
12. Paton, W.F., Erdjument-Bromage, H., Marks, A.R., Tempst, P., Taubman, M.B. Components of the protein synthesis and folding machinery are induced in vascular

smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic agents. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21404-21410.

13. Schelling, P., Fischer, H., Ganten, D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991; **9**: 3-15.

14. Duff, J.L., Marrero, M.B., Schieffer, B., Bernstein, K.E., Berk, B.C. Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovascular Research* 1995; **30**: 511-517.

15. Dubey, R.K., Jackson, E.K., Rupprecht, H.D., Sterzel, R.B. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1997; **6**: 88-105.

16. Egidio, J. Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* 1996; **49**: 578-597.

17. Geisterfer, A.A.T., Peach, M.J., Owens, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation Research* 1988; **62**: 749-756.

18. Leduc, I., Haddad, P., Giasson, E., Meloche, S. Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 1995; **48**: 582-592.

19. Schwartz, S.M., Campbell, G.R., Campbell, J.H. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* 1986; **58**: 427-444.

20. Owens, G.K. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1989; **257**: H1755-H1765.

21. Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T.E. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; **45**: 205-251.

22. Inagami, T., Mizukoshi, M., Guo, D.F. Angiotensin II receptor: molecular cloning, functions and regulation. Dans: *Angiotensin receptors*. Édité par: Saavedra, J.M., Timmermans, P.B.M.W.M. New York: Plenum Press, 1994; 1-15.

23. Yamada, T., Horiuchi, M., Dzau, V.J. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 156-160.

24. Muzenmaler, D.H., Greene, A.S. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial pressure. *Hypertension* 1996; **27**: 760-765.

25. Stoll, M., Meffert, S., Stroth, U., Unger, T. Growth or antigrowth: angiotensin and endothelium. *J Hypertens* 1995; **13**: 1529-1534.

26. Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S., Bernstein, K.E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991; **351**: 233-236.
27. Sasaki, K., Yamamoto, Y., Bardham, S.E. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991; **351**: 230-233.
28. Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasaura, H., Pratt, R.E., Dzau, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993; **268**: 24539-24542.
29. Murphy, T.J., Takeuchi, K., Alexander, R.W. Molecular cloning of AT1 angiotensin receptor subtype. *Am J Hypertens* 1992; **5**: 236-242.
30. Iwai, N., Inagami, T. Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 1992; **298**: 257-260.
31. Denhardt, D.T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 1996; **318**: 729-747.
32. Sonenberg, N. mRNA 5' cap-binding protein eIF-4E and growth control. Dans: *Translational control*. Édité par: Hershey, J.W.B., Mathews, M.B., Sonenberg, N. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996; 245-269.
33. Graves, J.D., Campbell, J.S., Krebs, E.G. Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Annals New York Academy of Sciences* 1994; 320-343.
34. Nishida, E., Gotoh, Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 128-131.
35. van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E., Lefkowitz, R.J. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* 1996; **17**: 698-714.
36. Griendling, K.K., Rittenhouse, S.E., Brock, T.A., Ekstein, L.S., Gimbrone, M.A.J., Alexander, R.W. Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986; **261**: 5901-5906.
37. Brock, T.A., Alexander, R.W.J., Ekstein, L.S., Atkinson, W.J., Gimbrone, M.A.J. Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1985; **7**: I-105-I-109.

38. Griendling, K.K., Tsuda, T., Berk, B.C., Alexander, R.W. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J Cardio Pharm* 1989; **14**: S-27-S-33.
39. Sturgil, T.W., Wu, J. Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1092**: 350-357.
40. Tsuda, T., Kawahara, Y., Ishida, Y., Koide, M., Shii, K., Yokoyama, M. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associate protein 2 kivases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1992; **71**: 620-630.
41. Taubman, M.B., Berk, B.C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R.W., Nadal-Ginard, B. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 1989; **264**: 526-530.
42. Griendling, K.K., Tsuda, T., Berk, B.C., Alexander, R.W. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle cells. Secondary signalling mechanisms. *Am J H ypertens* 1989; **2**: 659-665.
43. Catt, K.J., Balla, T., Baukal, A.J., Hausdorff, W.P., Aguilera, G. Control of glomerulosa cell function by angiotensin II: transduction by G-proteins and inositol phophates. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; **15**: 501-515.
44. Pfeilschifter, J. Cross-talk between transmembrane signalling systems: a prerequisite for the delicate regulation of glomerular haemodynamics by mesangial cells. *Eur J Clin Invest* 1989; **19**: 347-361.
45. Gerring, K. Intracellular ionic changes and cell activation: Regulation of DNA, RNA and protein synthesis. Dans: *Current topics in membranes and transport*. Édité par : Mandel, L.J., Benos, D.J. Orlando, Fla: Academic Press, 1986; 221-250.
46. Smith, R.D., Chiu, A.T., Wong, P.C., Hervlin, W.F., Timmermans, P.B.M.W.M. Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; **32**: 135-165.
47. Boynton, A.L., Whitefield, J.F. The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assesement of the evidence. *Adv Cyclic Nucleo Res* 1983; **15**: 193-294.
48. Rozengurt, E. Early signals in the mitogenic response. *Science* 1986; **234**: 161-166.
49. Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J., Sturgill, T.W. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Science* 1993; **262**: 1065-1069.
50. Blenis, J. Signal transduction via the MAP kinases: Proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 5889-5892.

51. Cobb, M.H., Boulton, T.G., Robbins, D.J. Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 1991; **2**: 965-978.
52. Crews, C.M., Alessandrini, A., Erikson, R.L. Erks: Their fifteen minutes has arrived. *Cell Growth Differ* 1992; **3**: 135-142.
53. Pelech, S.L., Sanghera, J.S. Mitogen-activated protein kinases: Versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 233-238.
54. Marshall, C.J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994; **4**: 82-89.
55. Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization. *J Biol Chem* 1990; **265**: 3202-3209.
56. Thomas, G. MAP kinase by any other name smells just as sweet. *Cell* 1992; **68**: 3-6.
57. Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Salughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., Cobb, M.H. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1991; **249**: 64-67.
58. Lenormand, P., Pagès, G., Sardet, C., L'Allemain, G., Meloche, S., Pouyssegur, J. Map kinase: Activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* 1993; **28**: 237-244.
59. Boulton, T.G., Cobb, M.H. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul* 1991; **2**: 357-371.
60. Her, J.H., Wu, J., Rall, T.B., Sturgill, T., Weber, M.J. Sequence of pp42/MAP kinase, a serine/threonine kinase regulated by tyrosine phosphorylation. *Nucl Ac Res* 1991; **19**: 37-43.
61. Meloche, S., Pagès, G., Pouyssegur, J. Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44^{mapk}. *Mol Biol Cell* 1992; **3**: 63-71.
62. Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P.E. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 1991; **10**: 885-892.
63. Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K., Sturgill, T.W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways of activation of MAP kinase. *Nature* 1990; **343**: 651-653.

64. Denton, R.M., Tavaré, M. Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur J Biochem* 1995; **227**: 597-611.
65. Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barret, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis, R.J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; **76**: 1025-1037.
66. Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I.H., Davis, R.J. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 1994; **265**: 806-808.
67. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; **7**: 2135-2148.
68. Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994; **369**: 156-160.
69. Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 1997; **16**: 1909-1920.
70. Meloche, S. Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *Journal of Cellular Physiology* 1995; **163**: 577-588.
71. Davis, R.J. The mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14553-14556.
72. Marshall, C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; **80**: 179-185.
73. Duff, J.L., Berk, B.C., Corson, M.A. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **188**: 257-264.
74. Vouret-Craviari, V., Van Obberghen-Schilling, E., Scimeca, J.C., Van Obberghen, E., Pouyssegur, J. Differential activation of p44^{mapk} (ERK 1) by α -thrombin and thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem J* 1993; **289**: 209-214.
75. Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S., Pouyssegur, J. Coordinate biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts: evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem* 1992; **267**: 13369-13375.

76. Chen, R.H., Sarnecki, C., Blenis, J. Nuclear localization and regulation of *erk*- and *rsk*-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992 ;**12**: 915-927.
77. Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J.R. Phosphorylation of *c-jun* mediated by MAP kinase. *Cell* 1991; **353**: 670-674.
78. Jackson, E.K., Garrison, J.C. Renin and angiotensin. Dans: *Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics*. Édité par: *Hardman, J.G., Gilman, A.G., Limbird, L.E.* New York: McGraw Hill Co. 1995; 733-758.
79. Dudley, D., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel, A.R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci* 1995; **92**: 7686-7689.
80. Servant, M.J., Giasson, E., Meloche, S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16047-16052.
81. Duff, J.L., Marrero, M.B., Paxton, W.G.e. Angiotensin II induces 3CH134, a protein tyrosine phosphatase, in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26037-26040.
82. Duff, J.L., Monia, B.P., Berk, B.C. Mitogen-activated (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 7161-7166.
83. Dzau, V.J., Gibbons, G.H., Pratt, R.E. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension* 1991; **18**: II-100-II-105.
84. Pouyssegur, J., Seuwen, K. Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu Rev Physiol* 1992; **54**: 195-210.
85. Sturgil, T.W., Ray, B.L., Erikson, E., Malher, J.L. Insuline-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates protein S6 kinase II. *Nature* 1988; **334**: 715-718.
86. Giasson, E., Servant, M.J., Melonche, S. Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 26879
87. Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panoyotou, G., Waterfield, M.D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducer. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 267-272.
88. Mendez, R., Myers, M.G.J., White, M.F., Rhoads, R.E. Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I

phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 2857-2864.

89. Chung, J., Grammer, T.C., Lemon, K.P., Kazlauskas, A., Blenis, J. PDGF- and insulin-dependent pp70^{S6K} activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994; **370**: 71-75.

90. Cheatham, B., Iagos, C.J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., Kahn, C.R. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 4902-4911.

91. Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, K., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T., Waterfield, M.D., Kasuga, M. 1-phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 7415-7419.

92. Yao, R., Cooper, G.M. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 1995; **267**: 2003-2006.

93. Chou, M.M. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 806-814.

94. Arcaro, A., Wymann, M.P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 1993; **296**: 297-301.

95. Saito, Y., Vandenheede, J.R., Cohen, P. The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J* 1994; **303**: 27-31.

96. Cross, D.A., Alessi, D.R., Vandenheede, J.R., McDowell, H.E., Hundal, H.S., Cohen, P. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 1994; **303**: 21-26.

97. Stewart, M.J. and Thomas, G. Mitogenesis and protein synthesis: A role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *BioEssays* 1994; **16**: 809-814.

98. Brown, E.J., Schreiber, S.L. A signaling pathway to translational control. *Cell* 1994; **86**: 517-520.

99. Kozma, S.C., Thomas, G. Serine/threonine kinases in the propagation of the early mitogenic response. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992; **119**: 123-155.

100. Flotow, H., Thomas, G. Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3074-3078.
101. Jones, S.W., Erickson, E., Blenis, J., Maller, J.L., Erickson, R.L. A *Xenopus* ribosomal protein kinase S6 has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases. *Proc Natl Acad Sci* 1988; **85**: 3377-3381.
102. Alcorta, D.A., Crews, C.M., Sweet, L.J., Bankston, L., Jones, S.W., Erickson, R.L. Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3850-3859.
103. Hershey, J.W.B. Protein phosphorylation controls translation rates. *J Biol Chem* 1989; **264**: 20823-20826.
104. Kozma, S.C., Ferrari, S., Thomas, G. Unmasking a growth factor/oncogene-activated S6 phosphorylation cascade. *Cell Signaling* 1989; **1**: 219-225.
105. Rychlik, W., Domier, L.L., Gardner, P.R., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E. Amino acid sequence of the mRNA cap-binding protein from human tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; **84**: 945-949.
106. Chung, J., Kuo, C.J., Crabtree, G.R., Blenis, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of signaling by the 70 kD S6 protein kinase. *Cell* 1992; **69**: 1227-1236.
107. Borman, S. Immunosuppressant drugs: Rapamycin target protein found. *Chem Eng News* 1994; **72**: 6-6.
108. Morley, S.J. Signal transduction mechanisms in the regulation of protein synthesis. *Molecular Biology Reports* 1994; **19**: 221-231.
109. Rhoads, R.E. Protein synthesis, cell growth and oncogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1991; **3**: 1019-1024.
110. Rhoads, R.E., Joshi-Barve, S., Rinker-Schaeffer, C. Mechanism of action and regulation of protein synthesis initiation factor 4E: Effects on mRNA discrimination, cellular growth rate, and oncogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995; **46**: 183-219.
111. Hershey, J.W.B. Translational control in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 1991; **60**: 717-755.
112. Sonenberg, N. Translation factors as effectors of cell growth and tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 955-960.

113. Brooks, R.F. Regulation of the fibroblast cell cycle by serum. *Nature* 1976; **260**: 248-250.
114. Redpath, N.T., Proud, C.G. Molecular mechanisms in the control of translation by hormones and growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1220**: 147-162.
115. Rhoads, R.E. Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J Biol Chem* 1993; **266**: 3017-3020.
116. Morley, S.J., Thomas, G. Intracellular messengers and the control of protein synthesis. *Pharmac Ther* 1991; **50**: 291-319.
117. Merrick, W.C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews* 1992; **56**: 291-315.
118. Voorma, H.O., Thomas, A.A.M., van Heugten, H.A.A. Initiation of protein synthesis in eukaryotes. *Molecular Biology Reports* 1994; **19**: 139-145.
119. Mader, S., Lee, H., Pause, A., Sonenberg, N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 α and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4990-4997.
121. Mader, S., Sonenberg, N. Cap binding complexes and cellular growth control. *Biochimie* 1995; **77**: 40-44.
122. Altmann, M., Muller, P.P., Pelletier, J., Sonenberg, N., Trachsel, H. A mammalian translation initiation factor can substitute for its yeast homologue *in vivo*. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12145-12147.
123. Rychlik, W., Rhoads, R.E. Nucleotide sequence of rabbit eIF-4E cDNA. *Nucl Ac Res* 1992; **20**: 6415
124. Hiremath, L.S., Hiremath, S.T., Rychlik, W., Joshi, S., Domier, L.L., Rhoads, R.E. *In vitro* synthesis, phosphorylation and localization on 48S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E. *J Biol Chem* 1989; **264**: 1132-1138.
125. Hentze, M.W. Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 393-398.
126. Sonenberg, N. ATP/Mg²⁺-dependent cross-linking of cap binding proteins to the 5' end of eukaryotic mRNA. *Nucl Ac Res* 1981; **9**: 1643-1656.
127. Hellmann, G.M., Chu, L.-Y., Rhoads, R.E. A polypeptide which reverses cap analog inhibition of cell-free protein synthesis. *J Biol Chem* 1982; **257**: 4056-4062.

128. Pelletier, J., Sonenberg, N. Photochemical cross-linking of cap binding proteins to eukaryotic mRNAs: effect of mRNA 5' secondary structure. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 3222-3230.
129. Lawson, T.G., Ray, B.K., Dodds, J.T., Grifo, J.A., Abramson, R.D., Merrick, W.C., Betsch, D.F., Weith, H.L. Influence of 5' proximal secondary structure on the translation efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors. *J Biol Chem* 1986; **261**: 13979-13989.
130. Altmann, M., Edery, I., Trachsel, H.J., Sonenberg, N. Site-directed mutagenesis of the tryptophan residues in yeast eukaryotic initiation factor 4E. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17229-17232.
131. Edery, I., Altmann, M., Sonenberg, N. High-level synthesis in *Escherichia coli* of functional cap-binding eukaryotic initiation factor eIF-4E and affinity purification using a simplified cap-analog resin. *Gene* 1988; **74**: 517-525.
132. Gingras, A.C., Donzé, O. Régulation par l'insuline de l'initiation de la synthèse protéique. *m/s* 1995; **11**: 866-872.
133. Duncan, R., Milburn, S., Hershey, J.W.B. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. *J Biol Chem* 1987; **262**: 380-388.
134. Zhang, Y., Klein, H.L., Schneider, R.J. Role of Ser-53 phosphorylation in the activity of human translation initiation factor eIF-4E in mammalian and yeast cells. *Gene* 1995; **163**: 283-288.
135. Flynn, A., Proud, C.G. Insulin-stimulated phosphorylation of initiation factor 4E is mediated by the MAP kinase pathway. *FEBS Lett* 1996; **389**: 162-166.
136. Whalen, S.G., Gingras, A.-C., Amankwa, L., Mader, S., Branton, P.E., Aebersold, R., Sonenberg, N. Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11831-11837.
137. Minich, W.B., Balasta, M.L., Goss, D.J., Rhoads, R.E. Chromatographic resolution of *in vivo* phosphorylation and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 7668-7672.
138. Rychlik, W., Russ, M.A., Rhoads, R.E. Phosphorylation site of eukaryotic initiation factor 4E. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10434-10437.

139. Joshi, B., Cai, A.L., Keiper, B.D., Minich, W.B., Mendez, R., Beach, C.M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R.E. Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14597-14603.
140. Makkinje, A., Xiong, H., Li, M., Damuni, Z. Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insulin-stimulated protamine kinase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14824-14828.
141. Bonneau, A.-M., Sonenberg, N. Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* 1987; **262**: 11134-11139.
142. Joshi-Barve, S., Rychlyk, W., Rhoads, R.E. Alteration of the major phosphorylation site of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E prevents its association with the 48S initiation complex. *J Biol Chem* 1990; **265**: 2979-2983.
143. Rao, G.N., Griendling, K.K., Frederickson, R.M., Sonenberg, N., Alexander, R.W. Angiotensin II induce phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 7180-7184.
144. Flynn, A., Proud, C.G. Insulin and phorbol ester stimulate initiation factor eIF-4E phosphorylation by distinct pathways in Chinese hamster ovary cells overexpressing the insulin receptor. *Eur J Biochem* 1996; **236**: 40-47.
145. Flynn, A., Proud, C.G. Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21684-21688.
146. Rinker-Schaeffer, C.W., Austin, V., Simmer, S., Rhoads, R.E. *Ras* transformation of cloned rat embryo fibroblasts results in increased rates of protein synthesis and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2593-2598.
147. Frederickson, R.M., Mushynski, W.E., Sonenberg, N. Phosphorylation of translation initiation factor eIF-4E is induced in a ras-dependent manner during nerve growth factor-mediated PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 1239-1247.
148. Frederickson, R.M., Sonenberg, N. eIF-4E phosphorylation and the regulation of protein synthesis. Dans: *Translational regulation of gene expression*. Édité par: Ilan, J. New York: Plenum Press, 1993; 143-162.
149. Haghghat, A., Mader, S., Pause, A., Sonenberg, N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J* 1995; **14**: 5701-5709.

150. Diggle, T.A., Denton, R.M. Comparison of the effects of insulin and adrenergic agonists on the phosphorylation of an acid-soluble 22 kDa protein in rat epididymal fat-pads and isolated fat-cells. *Biochem J* 1992; **282**: 729-736.
151. Lin, T.A., Kong, X., Saltiel, A.R., Blackshear, P.J., Lawrence, J.C.J. Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18531-18538.
152. Rosenwald, I.B. Upregulated expression of the genes encoding translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 α in transformed cells. *Cancer Letters* 1996; **102**: 113-123.
153. Rosenwald, I.B., Rhoads, D.B., Callanan, L.D., Isselbacher, K.J., Schmidt, E.V. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 α in response to growth induction by *c-myc*. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 6175-6178.
154. Lazaris-Karatzas, A., Montine, K.S., Sonenberg, N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 1990; **345**: 544-547.
155. Lazaris-Karatzas, A., Sonenberg, N. The mRNA 5' cap-binding protein, eIF-4E, cooperates with *v-myc* or E1A in the transformation of primary rodent fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 1234-1238.
156. Rosenwald, I.B., Lazaris-Karatzas, A., Sonenberg, N., Schmidt, E.V. Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 7358-7363.
157. Shantz, L.M., Pegg, A.E. Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation. *Cancer Res* 1994; **54**: 2313-2316.
158. De Benedetti, A., Joshi, B., Graff, J.R., Zimmer, S.G. CHO cells transformed by the translation factor eIF-4E display increased *c-myc* expression, but require overexpression of Max for tumorigenesis. *Mol Cell Differ* 1994; **2**: 347-371.
159. Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 1994; **371**: 762-767.
160. Lin, T., Kong, X., Haystead, T.A.J., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., Lawrence, J.C. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 1994; **266**: 653-656.
161. Hu, C., Pang, S., Kong, X., Velleca, M., Lawrence, J.C.J. Molecular cloning and tissue distribution of PHAS-I, an intracellular target for insulin and growth factors. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 3730-3734.

162. Haystead, T.A., Haystead, C.M., Hu, C., Lin, T.A., Lawrence, J.C.J. Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase. Identification of a site phosphorylated by MAP kinase *in vitro* and in response to insulin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 23185-23191.
163. Merrick, W.C., Hershey, J.W.B. The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. Dans: *Translational control*. Édité par: Hershey, J.W.B., Mathews, M.B., Sonenberg, N. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996; 31-69.
164. Pain, V.M. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 1996; **236**: 747-771.
165. Lamphear, B.J., Kirchwegger, R., Skern, T., Rhoads, R.E. Mapping of functional domains in eIF4G with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 21975-21983.
166. Altmann, M., Schmitz, N., Berset, C., Trachsel, H. A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J* 1997; **16**: 1114-1121.
167. Fleurent, M., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Meloche, S. Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a MAP kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997; **272**: 4006-4012.
168. Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Argast, G.M., Krebs, E.G., Kong, X., Lin, T.A., Lawrence, J.C. cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1995; **92**: 7222-7226.
169. Diggle, T., Schmitz-Peiffer, C., Borthwick, A.C., Welsh, G.I., Denton, R.M. Evidence that insulin activates casein kinase 2 in rat epididymal fat-cells and that this may result in the increased phosphorylation of an acid-soluble 22 kDa protein. *Biochem J* 1991; **279**: 545-551.
170. Ramakrishna, S., Beanjamin, W.B. Insulin stimulates phosphorylation of a heat-stable protein in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **117**: 758-764.
171. Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Raines, E.W., Potts, B.C., MacDonald, S.G., Ross, R., Krebs, E.G. Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 10300-10304.
172. Severson, B.R., Kong, X., Lawrence, J.C.J. Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 10305-10309.

173. Monfar, M., Lemon, K.P., Grammer, T.C., Cheatham, L., Chung, J., Vlahos, C.J., Blenis, J. Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 326-337.
174. Brown, E.J., Albers, M.A., Shin, T.B., Ichidawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., Schreiber, S.L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 1994; **369**: 756-758.
175. Sabatini, D.M., Erdjument-Bronage, H., Lui, M., Tempst, P., Synder, S.H. RAFT-1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; **78**: 35-43.
176. Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., Abraham, R.T. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 815-822.
177. Jefferies, H.B.J., Reingard, C., Kozma, S.C., Thomas, G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 4441-4445.
178. Schreiber, S.L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; **251**: 283-287.
179. Kunz, J., Hall, M.N. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* 1993; **18**: 334-338.
180. Clardy, J. The chemistry of signal transduction. *Proc Natl Acad Sci* 1995; **92**: 56-61.
181. Beretta, L., Gingras, A.-C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N., Sonenberg, N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996; **15**: 658-664.
182. von Manteuffel, S.R., Gingras, A.-C., Ming, X.-F., Sonenberg, N., Thomas, G. 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**: 4076-4080.
183. De Benedetti, A., Rhoads, R.E. Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. *Proc Natl Acad Sci* 1990; **87**: 8212-8216.
184. von Manteuffel, S.R., Dennis, P.B., Pullen, N., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Thomas, G. The insulin-induced signaling pathway leading to S6 and initiation factor 4E

binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70^{S6k}. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 5426-5436.

185. Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C.J., Abraham, R.T. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 1997; **277**: 99-101.

186. Ferrari, S., Thomas, G. S6 Phosphorylation and the p70^{S6k}/p85^{S6k}. *Critical Review in molecular Biochemistry and Biology* 1994; **29**: 385-413.

187. Sabatini, D.M., Lai, M.M., Snyder, S.H. Neuronal roles of immunophilins and their ligands. *Mol Neurobiol* 1997; **15**: 223-239.

188. Cross, M.J., Stewart, A., Hodgkin, M.N., Kerr, D.J., Wakelam, M.J.O. Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A₂ activity in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995; **270**:25352-25355.

189. Fadden, P., Haystead, T.A.J., Lawrence, J.C.J. Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10240-10247.