

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires impliqués dans l'action hypertrophique de
l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires**

Par

Marc Servant

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

février 1999

©Marc Servant, 1999



W
4
U58
1999
V.074

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Mécanismes moléculaires impliqués dans l'action hypertrophique de
l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses vasculaires**

Présentée par:

Marc Servant

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Denis deBlois :	président du jury
Dr. Sylvain Meloche :	directeur de recherche
Dr. Michel Bouvier :	membre du jury
Dr. Nathalie Rivard :	examinatrice externe
:	représentant du doyen

Thèse acceptée le : 1^{er} février 1999

SOMMAIRE

L'angiotensine II (Ang II) est une hormone peptidique impliquée dans la régulation de la pression artérielle et de la balance électrolytique. En plus de ces effets physiologiques classiques, des études récentes ont démontré que l'Ang II exerce un effet trophique (hypertrophie cellulaire) sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). On sait que l'Ang II exerce ses effets physiologiques en interagissant avec deux sous-types de récepteurs, désignés AT₁ et AT₂, pour activer diverses voies de signalisation intracellulaire. Des données obtenues dans notre laboratoire ont montré que la réponse hypertrophique de l'hormone est couplée au récepteur AT₁. Cependant, très peu de données existent sur les mécanismes de transduction de cette réponse hypertrophique dans les CMLV ou autres types cellulaires. L'objectif principal de mon projet de recherche de doctorat se concentre donc sur la caractérisation des voies de signalisation responsables de cette réponse hypertrophique.

Un des mécanismes essentiels impliqués dans l'obtention d'un phénotype hypertrophique est l'augmentation du taux de la synthèse protéique dans la cellule. Ce mécanisme sert donc de marqueur pour qualifier et quantifier les effets hypertrophiques d'une hormone sur les cellules cibles et nos résultats indiquent qu'effectivement l'Ang II induit une augmentation importante de la synthèse protéique dans les CMLV. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies de signalisation nous a permis de démontrer l'implication d'effecteurs importants dans la régulation des machineries transcriptionnelle et traductionnelle dans les CMLV stimulées par l'Ang II. Ainsi, nous avons démontré un rôle important de la voie des MAP kinases, plus spécifiquement du module Raf-MEK-ERK, dans l'action hypertrophique de l'hormone. Nos résultats indiquent que l'Ang II stimule fortement l'activité des ERKs dans les CMLV et que l'utilisation du PD98059, un inhibiteur spécifique de l'activation de MEK, inhibe l'activation de ces kinases de même que la synthèse protéique induite par l'Ang II. L'action bien caractérisée des ERKs au niveau de l'activation des facteurs de transcription et récemment au niveau de facteurs d'initiation de la traduction suggère ainsi une implication des machineries transcriptionnelle et traductionnelle dans les effets hypertrophiques de l'Ang II. La stimulation des CMLV par l'Ang II induit également la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines adaptatrices et enzymes impliquées dans l'action trophique de l'hormone. En accord avec cette observation, nous avons également noté qu'une élévation de l'AMPC dans nos cellules inhibait totalement l'effet

trophique de l'Ang II en inhibant spécifiquement les effets de l'hormone sur la phosphorylation sur tyrosine de certains effecteurs.

Nous nous sommes intéressés également aux événements précoces de signalisation impliqués dans l'effet trophique de l'Ang II. Grâce à la création d'une lignée cellulaire de fibroblastes exprimant de façon stable le récepteur AT₁ humain normal ou muté (Rat1-AT₁), nous avons pu mettre en évidence les propriétés intrinsèques du récepteur AT₁ ainsi que le rôle important de la voie des phosphoinositides dans l'action hypertrophique de l'Ang II.

L'Ang II est donc responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation, induisant ainsi l'hypertrophie des CMLV sans phénomène hyperplasique (division cellulaire). Un fait remarquable cependant est que le *platelet-derived growth factor* (PDGF)-BB, un mitogène puissant pour ces cellules, active des voies de signalisation similaires à celles stimulées par l'Ang II. Or, ce peptide vasoactif n'induit ni la synthèse d'ADN, ni division des CMLV. L'étude des effecteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire nous a permis de démontrer que contrairement à l'Ang II, le PDGF-BB induisait dans les CMLV une inhibition de l'expression de p27^{Kip1}, un inhibiteur général de la phase G₁ du cycle cellulaire. Ces résultats préliminaires indiquent que la régulation de l'expression de p27^{Kip1} peut être une composante moléculaire déterminante dans la réponse phénotypique des CMLV.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1.0 L'angiotensine II et le système cardiovasculaire.....	2
1.1 Le système rénine-angiotensine (RAS).....	2
1.2 Rôles physiologiques du RAS.....	3
1.2.1 Le rein.....	5
1.2.2 La glande surrénale.....	5
1.2.3 Le système nerveux central et périphérique.....	6
1.2.4 Le coeur.....	6
1.2.5 L'endothélium vasculaire.....	6
1.2.6 Les CMLV.....	7
1.3 L'Ang II, un facteur de croissance: preuves de son implication dans les pathologies du système cardiovasculaire.....	8
2.0 Les récepteurs de l'Ang II.....	11
2.1 Propriétés pharmacologiques et biochimiques des sous-types de récepteurs de l'Ang II.....	11
2.2 Distribution tissulaire des sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂.....	17
2.3 Désensibilisation des récepteurs.....	18
2.3.1 Définition et exemples.....	18
2.3.2 Désensibilisation rapide du récepteur AT ₁ : découplage et séquestration.....	20
2.3.3 Désensibilisation à long terme du récepteur AT ₁ : régulation négative.....	22

2.4	Caractéristiques des souris transgéniques nulles au locus des gènes AT ₁ et AT ₂	24
3.0	Les bases moléculaires de l'action hypertrophique de l'Ang II dans les CMLV.....	25
3.1	Implication importante des machineries transcriptionnelle et traductionnelle.....	25
3.2	Signalisation précoce dans les CMLV: les seconds messagers.....	29
3.2.1	Les seconds messagers dérivés des phospholipides et des nucléotides: l'InsP ₃ , le diacylglycérol et l'AMPc.....	29
3.2.2	Les canaux ioniques.....	31
3.3	Signalisation intermédiaire.....	32
3.3.1	La PLA ₂ et la PLD.....	32
3.3.2	Les sérine/thréonine kinases.....	33
3.3.2.1	Les PKCs.....	34
3.3.2.2	Les CAM/kinases.....	35
3.3.2.3	Les MAP kinases ERK.....	36
3.3.3	Les tyrosines kinases.....	42
3.3.3.1	La famille Src.....	42
3.3.3.2	FAK et PYK2.....	44
3.3.3.3	La famille des JAKs.....	45
3.3.3.4	Les interactions avec les récepteurs à activité tyrosine kinase: cas des récepteurs au PDGF et à l'EGF....	47
3.3.4	La PI3-kinase et la voie de la p70 ^{s6k}	48
3.3.5	Les phosphatases.....	50
3.3.5.1	SHP-2.....	51
3.3.6	L'échangeur Na ⁺ /H ⁺	51
3.3.7	Le système d'oxydation NADH/NADPH.....	52
3.4	Signalisation tardive.....	52
3.4.1	L'expression des gènes précoces.....	53
3.4.1.1	Les facteurs de transcription.....	53
3.4.1.2	La phosphatase des MAP kinases: MKP-1.....	54

3.4.2	Les gènes tardifs.....	55
3.4.2.1	Exemples de l' α -actine, du TGF- β , du bFGF et de la chaîne A du PDGF.....	55
3.4.2.2	Le système γ^+	56
3.5	L'insuline, un facteur de croissance majeur dans la régulation de la synthèse protéique.....	57
4.0	Angiotensine II: hypertrophie vs hyperplasie.....	58
4.1	Le cycle cellulaire.....	59
4.2	Les Cdks et les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de leur activité.....	61
4.2.1	Les Cdks et les cyclines.....	62
4.2.2	La phosphorylation et la déphosphorylation des Cdks.....	63
4.2.3	Les inhibiteurs des Cdks.....	64
4.2.3.1	Les protéines Ink4.....	64
4.2.3.1.1	p15 ^{Ink4b}	64
4.2.3.1.2	p16 ^{Ink4a}	67
4.2.3.2	Les protéines Cip/Kip.....	68
4.2.3.2.1	p21 ^{Cip1}	69
4.2.3.2.2	p27 ^{Kip1}	70
4.2.3.2.3	p57 ^{Kip2}	72
4.2.4	La voie MAP kinases ERK et le cycle cellulaire.....	72
5.0	Objectifs de la présente étude.....	74
CHAPITRE II: RÉSULTATS.....		76
	Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells.....	77

Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signalling in vascular smooth muscle cells.....	84
Differential regulation of Cdk2 activity and p27 ^{Kip1} expression by mitogenic and hypertrophic factors in rat vascular smooth muscle cells.....	93
Angiotensin II stimulates protein synthesis but not DNA synthesis in rat fibroblasts expressing the human AT ₁ receptor....	150
CHAPITRE III: DISCUSSION.....	183
1.0 Implication de la voie ERK dans l'action hypertrophique de l'Ang II.....	185
1.1 La machinerie transcriptionnelle.....	186
1.2 La machinerie traductionnelle.....	187
1.3 Application clinique.....	190
2.0 L'AMPC, un antagoniste physiologique de l'action hypertrophique de l'Ang II.....	191
2.1 Application clinique.....	184
3.0 p27^{Kip1}: un facteur important dans la réponse phénotypique des CMLV.....	194
3.1 Applications cliniques.....	199
4.0 Modèle Rat1-AT₁ humain.....	200
4.1 Événements de signalisation précoces.....	201
5.0 Résumé.....	204
Conclusion.....	207
Bibliographie.....	209
Annexe.....	i

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Propriétés pharmacologiques et biochimiques des sous-types de récepteurs de l'Ang II.....	12
Tableau II:	Voies classiques des MAP kinases.....	38
Tableau III:	Inhibiteurs des Cdk _s	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Le système rénine-angiotensine (RAS).....	4
Figure 2:	Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II.....	14-15
Figure 3:	Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteur AT ₁	26-27
Figure 4:	Organisation des sites de liaison des facteurs de transcription dans le promoteur du gène <i>c-fos</i>	41
Figure 5:	Les phases du cycle cellulaire et les différents effecteurs impliqués dans la transition des différentes phases.....	60
Figure 6:	Régulation de l'activité enzymatique des Cdk _s	65
Figure 7:	Construction pGEMCAT/poI/LUC.....	189
Figure 8:	Le AG490 inhibe la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV.....	193
Figure 9:	Schéma représentant les mécanismes moléculaires impliqués dans la baisse d'expression de p27 ^{Kip1} par un mitogène dans les CMLV.....	197
Figure 10:	La mutation du résidu acide aspartique 74 en acide glutamique dans le récepteur AT ₁ humain (AT ₁ D74E) abolit la couplage fonctionnel entre le récepteur et la PLC.....	202
Figure 11:	Le découplage fonctionnel du récepteur AT ₁ de la PLC inhibe l'activation de la synthèse protéique par l'Ang II...	203

Figure 12: Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteur AT ₁ (résumé de l'étude).....	205
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	angiotensin converting enzyme
ACTH	hormone adrénocorticotropine
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADH	hormone anti-diurétique ou vasopressine
ADP	adénosine bisphosphate
AKT	produit du proto-oncogène c-akt/protéine kinase B
ATP	adénosine trisphosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Ang II	angiotensine II (octapeptide, 1-8)
Ang III	angiotensine III (fragment 1-7)
Ang IV	angiotensine IV (fragment 3-7)
ANP	peptide natriurétique des oreillettes
AP-1	activator protein-1
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
AT ₁	sous-type AT ₁ des récepteurs de l'Ang II
AT ₂	sous-type AT ₂ des récepteurs de l'Ang II
ATF	activating transcription factor
CAK	Cdk-activating kinase
CAM	calmoduline
CAM kinase	protéine kinase Ca ²⁺ -calmoduline dépendante
Ca ²⁺	calcium
[Ca ²⁺] _i	concentration intracellulaire en Ca ²⁺
CAT	cationic amino acid transporter gene
cdc25	phosphatase à double spécificité
cdc42	cell division cycle gene 42
Cdk	cyclin-dependent kinase
Cdi 1	Cdk interator 1
Cip	Cdk-interacting protein 1
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires aortiques
CRE	cAMP response element

CREB	CRE binding protein
CREM	CRE modulator
DAG	1,2-diacylglycérol
DTT	dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor
eIF	facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes
4E-BP	4E-binding protein
Elk-1	Ets-like transcription factor
Egr-1	early growth reponse gene-1
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
ET	endothéline
FAK	focal adhesion kinase
bFGF	basic fibroblast growth factor
GAP	GTPase-activating protein
GDP	guanosine bisphosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
Grb2	growth-factor-receptor-bound protein 2
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GSK-3	glycogen synthase kinase-3
GTP	guanosine trisphosphate
H ⁺	hydrogène
HSP	heat shock protein
IBMX	3-isobutyl-1-méthylxanthine
Ink4	<u>i</u> nhibitor of Cdk4 (and Cdk6)
InsP ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
IRES	internal ribosomal entry site
IRS-1	insulin receptor substrate-1
JAK/TYK	Janus kinase
JNK	c-Jun amino-terminal kinase
K ⁺	potassium
KAP	Cdk-associated phosphatase
kDa	kiloDaltons
Kip 1	kinase inhibitory protein-1
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAP-1	MAPK-activated protein kinase ou p90 ^{rsk}

MDEV	médiateur dérivé de l'endothélium vasculaire
MEK	MAP/ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MKP	MAP kinase phosphatase
MNK1	MAP kinase interacting kinase 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na ⁺	sodium
NCK	a novel cytoplasmic protein
p70 ^{s6k}	p70 S6 kinase
PAC-1	phosphatase of activated cells
PAK	p21-activated protein kinase
PDBu	Phorbol 12-,13-dibutyrate
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK1	PI 3,4-bisphosphate/PIP ₃ -dependent kinase 1
PH	pleckstrin homology
PI3-kinase	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	PI 4,5-bisphosphate
PIP ₃	PI 3,4,5-trisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PMA	phorbol 12-myristate, 13-acétate
pRb	produit du gène du rétinoblastome
PTB	phosphotyrosine binding domain
PTK	protéine tyrosine kinase
PYK2	proline-rich tyrosine kinase 2
p21 ^{ras}	rat sarcoma virus
p38	reactivating kinase
Rac	Ras-related C ₃ -botulinum toxin substrate
Raf-1/A-Raf/B-Raf	MAP kinase kinase kinases
RAFT1	rapamycin and FKBP12 target 1
RAS	renin-angiotensine system
SAP-1	SRF accessory protein 1 ou stress-activated protein 1

SAPK	stress-activated protein kinase
SH	Src homology
SH-PTP	SH-domain-containing protein tyrosine phosphatase
Shc	SH2-domain-containing α 2-collagen-related
SIE	<i>sis</i> -inducing element
SIF	<i>sis</i> -inducing factor
Sos	son of sevenless
c-Src	pp60 ^{c-src} kinase
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
STAT	signal transducer and activator of transcription
Ste20	sterile 20
TAK	TGF β -activated kinase
TAO	thousand and one amino acid kinase
TGF β	transforming growth factor- β
tm	transmembranaire
TPA	12-tétradécanoyl phorbol 13-acétate
UBF	upstream binding factor
U.V.	ultraviolet
VIP	peptide vasoactif de l'intestin
Wee 1	kinase à double spécificité

*Merci à toi Florence pour ta patience
et tes encouragements...*

*Merci également pour tous les moments
d'attention et de tendresse que tu as
donnés à Christophe au cours de ces
quatre dernières années...
Cet enfant est heureux...*

Merci à toi Christophe pour ta patience...

*Merci à vous mes parents et frères pour votre amour
et vos encouragements...*

et

Bienvenue à Matis...

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Meloche pour ses conseils judicieux, son écoute, sa disponibilité quasi quotidienne malgré son horaire très chargé et finalement pour les nombreuses heures qu'il a investies non seulement dans ma formation au doctorat mais également en tant que futur chercheur autonome.

Je remercie les Drs Denis deBlois, Nathalie Rivard et Michel Bouvier pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ma formation au cours de ces quatre dernières années (professeurs, étudiants, secrétaires.....)

Finalement, je remercie tous mes collègues de travail et amis avec lesquels j'ai eu l'opportunité de communiquer et d'échanger sur des sujets scientifiques mais également sur la vie en général. La patience, l'aide et l'amitié qu'ils m'ont manifestées furent très précieuses au cours de ces quatre dernières années. Je remercie plus particulièrement: Jean-Claude Scimeca, Marc Saba El Leil, Édith Giasson, Manon Fleurent, Johanne Pellerin, Deng-Fu Guo, Laure Voisin, Kailesh Gopalbaih, Sylvain Foisy, Bruno Gingras, Mathieu Arcand, Sonia Girouard, François Francoeur, Dominic Devost et "ses femmes", sans oublier Régis et Viviane qui sans eux, le roulement quotidien du labo serait impossible...

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.0 L'angiotensine II et le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire, grâce à son réseau très élaboré d'artères, d'artérioles, de capillaires et de veines, est responsable de l'acheminement des nutriments (hormones, vitamines, sucres, peptides, lipides, minéraux...), des échanges gazeux (CO₂ et O₂) et du transport des déchets métaboliques, dans le but de maintenir un milieu adéquat pour la survie et la croissance de toutes les cellules de l'organisme. La pression sanguine, découlant directement de la force qu'exerce le sang sur les parois des vaisseaux sanguins, est contrôlée principalement par le coeur, ainsi que par le diamètre et l'élasticité des vaisseaux sanguins, source principale de résistance lors de la contraction cardiaque. Bien que plusieurs hormones et catécholamines contrôlent directement les paramètres cardiaques (force de contraction et battements), plusieurs hormones ou peptides vasoactifs contrôlent également la pression artérielle en influençant la fonction de plusieurs organes et tissus tels que la glande surrénale, le rein et le tissu musculaire lisse qui compose majoritairement les artères et les artérioles. L'angiotensine II (Ang II) est un peptide de la classe des hormones à action vasoactive. Inclus également dans cette classe: les kinines, la vasopressine, le peptide natriurétique des oreillettes (ANP), l'endothéline, le peptide vasoactif de l'intestin (VIP), la substance P et les cathécholamines (Reid, 1995). Un aspect remarquable de l'Ang II est la grande diversité de réponses physiologiques qu'engendre cet octapeptide (voir plus bas). Pour cette raison, la synthèse de ce peptide est hautement contrôlée et fait intervenir plusieurs effecteurs que l'on a regroupés sous la terminologie de "système rénine-angiotensine", ou "*renin-angiotensin system*" (RAS).

1.1 Le système rénine-angiotensine (RAS)

En 1898, Robert Tigerstedt démontrait que des extraits rénaux de lapin contenaient une substance vasoactive qu'il a appelé rénine (Tigerstedt et Bergman, 1898). Ce n'est pourtant que plusieurs années plus tard que deux groupes indépendants, Page et Helmer aux États-Unis et Braun-Menendez en Argentine, ont démontré que l'action de la rénine était de libérer une substance possédant des propriétés hypertensives (Braun-Menendez et al., 1940; Page et Helmer, 1940). Aujourd'hui, cette substance est appelée Ang II. Les effecteurs et partenaires se retrouvant entre la rénine et l'Ang II sont maintenant bien caractérisés et porte le nom de RAS (Timmermans et al., 1993). Le rôle principal de ce système est la régulation de la pression artérielle, d'une façon directe ou indirecte en influençant les paramètres

cardiaques, la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et le métabolisme hydrosodé pour ne citer que quelques exemples. La figure 1 (page 4) résume les principaux partenaires impliqués dans la synthèse de l'Ang II. Le RAS systémique ou circulant implique premièrement la rénine, une aspartyle protéase produite et stockée par les cellules juxtaglomérulaires du rein qui clive dans la circulation l'angiotensinogène, une α_2 -globuline produite par le foie. Cette réaction produit un décapeptide, l'Ang I. Ce dernier, pharmacologiquement inactif, est ensuite clivé par l'enzyme de conversion "angiotensin-converting enzyme" (ACE), une protéase principalement d'origine endothéliale se retrouvant en très grande quantité dans les poumons. Cette réaction donne lieu à la production de l'Ang II, l'octapeptide actif se liant aux récepteurs de l'Ang II sur les cellules cibles (voir plus bas). L'Ang II circulant à un temps de demie-vie très court (10 à 20 secondes) et cela grâce à la présence de protéases (angiotensinases) produisant des fragments inactifs et actifs tels que l'Ang III, l'Ang IV et le fragment 1-7 (Morton, 1993). La présence de ces angiotensinases est essentielle car elles font partie des mécanismes impliqués dans la terminaison d'un signal physiologique. La désensibilisation réceptorielle fait aussi partie de ces mécanismes (Böhm et al., 1997) (voir plus bas). La figure 1 illustre également le fait que la production de l'Ang II peut se faire de façon locale grâce à la présence dans différents tissus (cardiaque, vasculaire, rénal...) de tous les précurseurs et protéases nécessaire à la production de l'Ang II. En accord avec la participation importante d'un RAS tissulaire dans les effets physiologiques de l'Ang II, les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence que 90 à 99% de l'ACE dans le corps humain est d'origine tissulaire alors que seulement 1 à 10% est retrouvé dans la circulation (Dzau, 1993).

1.2 Rôles physiologiques du RAS

Un manque important en Na^+ , la sténose aortique rénale, l'insuffisance cardiaque, ou toutes autres conditions associées à une diminution du volume sanguin et de la pression sanguine conduisent à l'activation du RAS. Les principaux rôles physiologiques du RAS découlent directement de son effecteur, l'Ang II. Les rôles de ce peptide sont nombreux. Ayant des effets bien caractérisés au niveau du système nerveux central et périphérique, du coeur et des vaisseaux sanguins, du rein et de la glande surrénale, on se rend compte que le rôle principal de ce peptide vasoactif est de s'opposer à une baisse subite ou continue de la pression sanguine. Les effets de l'Ang II sur les systèmes cardiovasculaire, endocrine et nerveux dépendent de sa

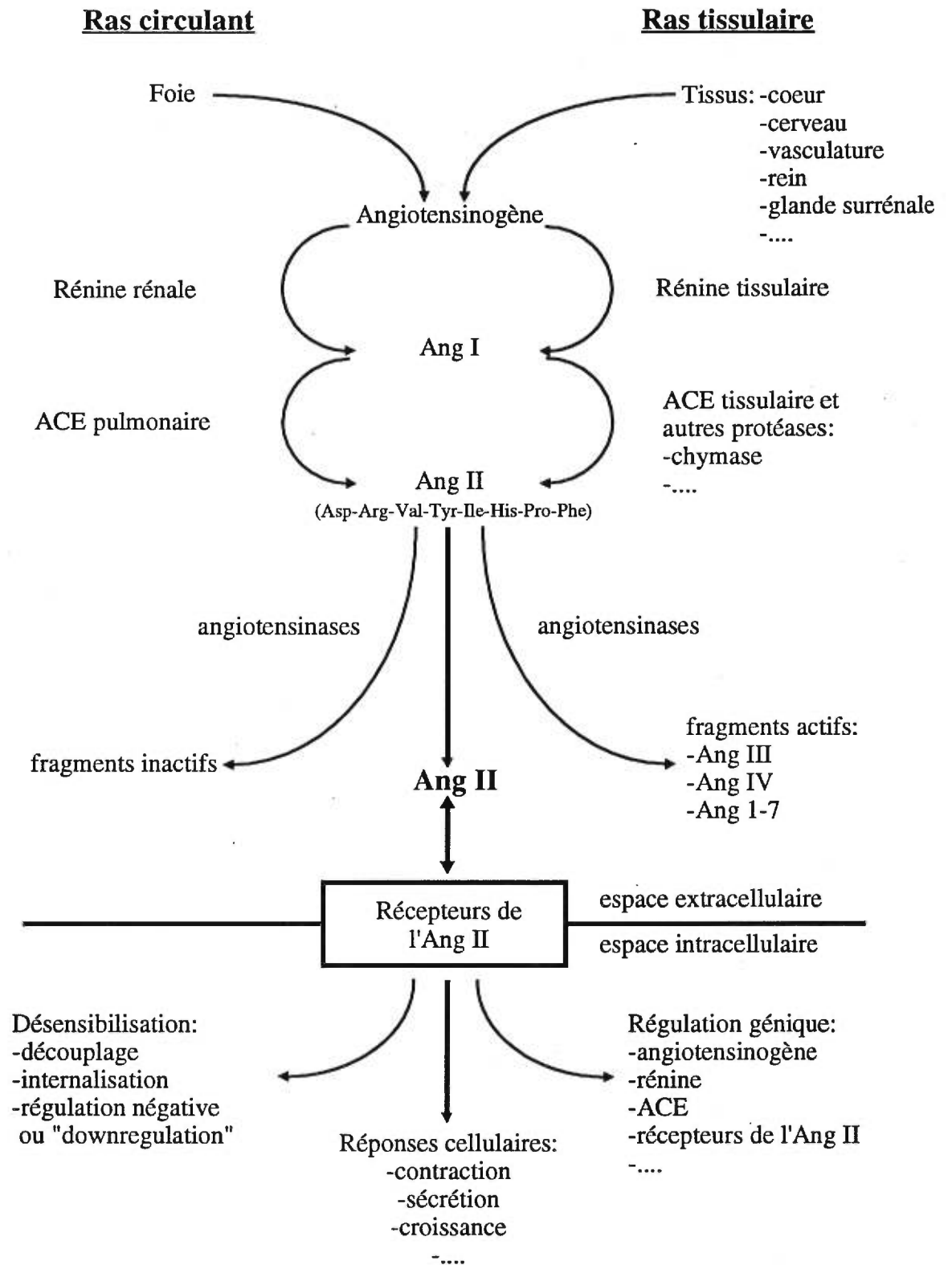


Figure 1: Le système rénine-angiotensine (RAS).
Schéma tiré de Timmermans et al., 1993. Voir le
texte pour les abréviations.

liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. Comme nous le verrons, il y a deux sous-types : AT₁ et AT₂ (voir plus bas). Sauf mention pour le sous-type AT₂, tous les effets physiologiques et pathologiques de même que la signalisation intracellulaire (voir plus bas) dépendants de l'Ang II et décrits dans cette thèse sont relayés par le sous-type AT₁.

1.2.1 Le rein

Les effets de l'Ang II au niveau rénal sont nombreux (Schalekamp et Derkx, 1993). Les trois principaux effets sont: 1) contrôle de la filtration glomérulaire et de la perfusion intrarénale. En effet, l'Ang II est un vasoconstricteur puissant, surtout au niveau des artérioles efférentes (vaisseaux postglomérulaires). Il a donc pour effet d'augmenter la pression artérielle afférente (vaisseaux préglomérulaires) et augmente ainsi le taux de filtration glomérulaire (TFG). Ceci permet de prévenir une diminution du TFG et de maintenir l'excrétion des produits métaboliques lors d'une baisse de la pression sanguine; 2) stimulation de la réabsorption sodique au niveau du tubule proximal. Les mécanismes par lesquels l'Ang II augmente le transport du Na⁺ ne sont pas encore entièrement caractérisés. Cependant, des études suggèrent que ce peptide aurait des actions multiples telles que l'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺ du côté apical et du co-transporteur Na⁺/HCO₃⁻ du côté basolatéral. Des données suggèrent également que l'Ang II pourrait stimuler directement la Na⁺/K⁺ ATPase du côté basolatéral; 3) inhibition de la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires. Cette inhibition représente une des nombreuses boucles de rétroaction négative dont s'est doté l'organisme dans le but de contrôler la synthèse d'une molécule par l'action même de cette dernière sur certains effecteurs impliqués dans sa synthèse.

1.2.2 La glande surrénale

L'Ang II influence aussi l'homéostasie hydrosodique par des mécanismes indépendant des reins. En effet, cette hormone stimule la biosynthèse de même que la libération d'aldostérone par les cellules glomérulaires du cortex surrénalien (Espiner et Nicholls, 1993). L'aldostérone ainsi libérée provoque une réabsorption sodique au niveau des tubules collecteurs rénaux en augmentant le nombre des canaux sodiques du côté apical et l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase du côté basolatéral. Au niveau de la médullo-surrénale, l'Ang II stimule également la libération des catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine).

1.2.3 Le système nerveux central et périphérique

Au niveau du système nerveux central, les actions les plus remarquées de l'Ang II sont le déclenchement de la soif (effet dipsogénique), la sécrétion de vasopressine et de l'ACTH ainsi que des effets sur le comportement (Brooks et Ruffolo, 1994). La vasopressine ou ADH est une hormone antidiurétique qui permet une réabsorption de l'eau au niveau des tubules collecteurs rénaux grâce à la fusion de vésicules contenant des canaux hydriques du côté apical. L'ACTH, quant à elle, provoque la synthèse et la libération des corticostéroïdes, dont l'aldostérone, par les glandes surrénales. Des effets sur le comportement ont été observés chez des souris transgéniques nulles au locus du gène AT_2 (un des deux sous-types de récepteurs de l'Ang II, voir plus bas) et peu d'informations sont disponibles à ce jour pouvant expliquer la diminution générale de l'activité motrice observée chez ces animaux (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). Pour ce qui est du système périphérique, l'Ang II est impliqué dans la facilitation de la transmission sympathique par un action sur les terminaisons nerveuses adrénérgiques (Squire et Reid, 1993). Cet effet est la conséquence directe d'une augmentation de la libération de norépinéphrine et d'une baisse de sa recapture au niveau post-synaptique.

1.2.4 Le coeur

L'Ang II a des effets directs sur le tissu cardiaque. Il provoque la contraction des myocytes cardiaques, d'où les effets inotropiques (force de contraction) et chonotropiques (battements) positifs de ce peptide (Dzau et Pratt, 1993). Ce dernier stimule aussi l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes (Leri et al., 1998; Liu et al., 1998) et induit la vasoconstriction des coronaires (Dzau et Pratt, 1993).

1.2.5 L'endothélium vasculaire

La présence du sous-type AT_1 des récepteurs de l'Ang II sur les cellules endothéliales suggère un rôle de l'Ang II dans la synthèse et la libération de médiateurs dérivés de l'endothélium vasculaire (MDEV). Ces derniers peuvent, par la suite, moduler les effets vasoconstricteurs de l'Ang II sur les CMLV (Vanhoutte et al., 1993). Trois MDEV semblent être impliqués dans les effets vasculaires de l'Ang II: 1) l'oxyde nitrique (NO), 2) les métabolites de l'acide arachidonique (les prostaglandines et prostacyclines) et 3) l'endothéline.

La libération basale de NO par les cellules endothéliales est impliquée dans la vasorelaxation du système vasculaire, permettant ainsi de créer un seuil physiologique de sensibilité aux vasoconstricteurs. La libération de NO peut cependant être augmentée par l'Ang II et ce parfois de façon tellement importante que la contraction des carotides et des artères mésentériques par l'Ang II est diminuée grandement par la présence de l'endothélium vasculaire (Yen et al., 1990; Boulanger et al., 1995).

À l'inverse, l'Ang II induit également des vasoconstrictions dépendant de l'endothélium. Par exemple, dans les coronaires de singe, les contractions dépendant de l'Ang II sont diminuées par un traitement à l'indométhacine (inhibiteur de la cyclo-oxygénase) et la dénudation endothéliale (Vanhoutte et al., 1993). La contribution réelle des prostaglandines dérivée de l'endothélium dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II est cependant difficile à analyser de part le fait que ce peptide génère également des métabolites de la cyclo-oxygénase dans les CMLV (voir plus bas). La stimulation des cellules endothéliales vasculaires par l'Ang II provoque également la production de prostacycline, un vasodilatateur puissant. Ces effets vasorelaxant de l'Ang II sur la production locale de prostacycline ont été démontrés *in vivo* dans les artères rénales canines (Toda, 1984).

La stimulation des cellules endothéliales et des CMLV par l'Ang II provoque la synthèse et la libération du plus puissant vasoconstricteur connu à ce jour, l'endothéline-1 (ET-1). En plus de l'effet vasoconstricteur, ce dernier est responsable de la production de NO par les cellules endothéliales et c'est par l'intermédiaire de l'ET-1 que l'Ang II induit cette libération de NO. La synthèse et la libération de l'ET-1 par l'Ang II est un processus assez long, donc probablement peu impliqué dans une vasoconstriction rapide suite à une baisse de la pression sanguine. Cependant, cette synthèse et libération peuvent contribuer de façon importante à l'élévation soutenue de la pression sanguine (Vanhoutte et al., 1993).

1.2.6 Les CMLV

Les CMLV sont la principale composante de la média des artères et artérioles chez les mammifères. *In vivo*, ces cellules ont un cytoplasme constitué d'une quantité importante de myofilaments spécialisés dans la contraction cellulaire, incluant des isoformes spécifiques de l'actine (α -actine) et de la myosine. Ces cellules, en stade final de différenciation, ont un phénotype contractile, c'est-à-dire, qu'elles ne migrent

pas, sont relativement insensibles aux mitogènes (donc toujours quiescentes) et répondent aux vasoconstricteurs comme les catécholamines, l'endothéline et l'Ang II (Thyberg, 1996). Elles sont donc spécifiquement impliquées dans la régulation de la pression sanguine, ayant la possibilité de contrôler le diamètre des vaisseaux sanguins par la vasoconstriction. Cependant, ces cellules sont dotées d'une grande plasticité, et elle peuvent, sous certaines conditions, se différencier en un phénotype dit "synthétique" (Thyberg, 1996). Ce phénotype est présent lors de la mise en culture primaire ou secondaire des CMLV mais aussi *in vivo* dans la vasculogénèse chez le fœtus et de façon importante dans certaines pathologies du système cardiovasculaire, dont les lésions athérosclérotiques, l'hypertrophie cardiaque et la resténose post-angioplastie. Ce phénotype synthétique se caractérise donc par des CMLV: 1) sensibles aux mitogènes comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines ou *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le basic fibroblast growth factor (bFGF), 2) dotées d'une capacité migratoire, 3) sécrétant de façon intense des composantes de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, fibronectine, thrombospondine, glycosaminoglycans), 4) et ne contractant plus en présence de peptides vasoactifs (Thyberg, 1996). Les CMLV en culture sont donc un modèle de choix afin de comprendre leur implication dans certaines pathologies vasculaires. Comme nous le verrons, suite à l'activation du récepteur AT₁, l'Ang II induit l'apparition d'un phénotype hypertrophique des CMLV en culture, d'où l'implication possible de ce peptide vasoactif dans la génèse et le maintien de certaines maladies cardiovasculaires. Des articles indiquant la provenance et les méthodes de culture de ces cellules sont citées dans le chapitre II. Ces informations sont néanmoins disponibles en annexe.

1.3 L'Ang II, un facteur de croissance: preuves de son implication dans les pathologies du système cardiovasculaire

L'hypertrophie vasculaire et cardiaque sont associés à l'hypertension quelque soit la cause menant à cette dernière (essentielle, rénovasculaire, etc...). Plusieurs études portant sur l'examen morphologique de tissus provenant d'animaux avec hypertension génétique ou induite (sténose aortique, etc...) et de patients avec une hypertension essentielle, ont démontré certains phénotypes particuliers aux tissus. Ainsi, l'hypertrophie cardiaque et celle des gros vaisseaux est due à l'hypertrophie cellulaire (augmentation de la taille cellulaire), l'induction de la polyploidie (synthèse d'ADN active sans mitose cellulaire) et l'augmentation des dépôts de matrice extracellulaire (collagène, élastine, fibronectine, thrombospondine,

glycosaminoglycans, etc...). Cependant, l'hypertrophie dans les petits vaisseaux de résistance (artérioles) peut impliquer l'hyperplasie cellulaire (augmentation du nombre de cellules), le dépôts de matrice extracellulaire ou un remodelage eutrophique, c'est-à-dire, un rétrécissement de la lumière sans changement de la masse vasculaire (Dzau et Pratt, 1993; Schwartz et al., 1995). Depuis quelques années, les chercheurs reconnaissent au moins deux composantes majeures dans l'induction et le maintien des modifications tissulaires associées à l'hypertension: 1) le "stretch" ou étirement mécanique qu'impose la pression sur le tissu cardiaque et les vaisseaux sanguins et 2) une composante humorale plus ou moins bien définie comprenant des hormones vasoactives, des mitogènes, des cytokines, etc... De cette composante humorale, c'est le RAS et donc l'Ang II qui, au cours des dernières années, a retenu de façon importante l'attention des fundamentalistes, des compagnies pharmaceutiques et des cliniciens. Effectivement, en plus de tous les effets physiologiques de l'Ang II cités plus haut, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* démontrent que ce peptide contrôle également la croissance de plusieurs types cellulaires. L'implication de l'Ang II comme facteur de croissance *in vivo* a été observée et étudiée de façon très importante dans le tissu cardiaque et le muscle lisse vasculaire. Ainsi, l'administration d'Ang II à des rats, à des doses n'influençant aucunement la pression sanguine à court terme, conduit au développement d'une hypertrophie vasculaire et cardiaque (Griffin et al., 1991; Kim et al., 1995b). D'autres études démontrent un ralentissement de la croissance rapide du coeur chez le porc nouveau-né ainsi que l'inhibition de l'hypertrophie du myocarde et vasculaire chez des rats avec surcharge volumétrique ou des rats génétiquement hypertendus (SHR) traités par des inhibiteurs de l'ACE ou un antagoniste AT₁ (Baker et al., 1990; Brooks et Ruffolo, 1994). La fonction de l'Ang II comme facteur de croissance prend encore plus d'importance lors du choix du traitement qui s'impose pour traiter une hypertrophie d'ordre vasculaire ou cardiaque associée à l'hypertension. Ainsi, les inhibiteurs de l'ACE semblent être plus efficaces pour renverser un phénotype hypertrophique que des vasodilatateurs non-spécifiques ou des β -bloqueurs qui ont tous pourtant la même efficacité pour diminuer la pression sanguine systémique (Brooks et Ruffolo, 1994). Citons également le fait que la synthèse des récepteurs AT₁ cardiaques augmente au cours de l'hypertrophie cardiaque d'origine expérimentale ou génétique chez l'animal, suggérant un rôle du récepteur dans la gènèse ou le maintien de la croissance exagérée de ce tissu (Sun et Weber, 1994a; Fujii et al., 1995; Lambert et al., 1995). Du point de vue moléculaire, une étude élégante, utilisant un gène rapporteur luciférase modulé par le promoteur AT₁ et injecté directement dans les ventricules de rat soumis à une pré-charge élevée (par coarctation aortique), a démontré

la participation essentielle des facteurs de transcription GATA-4 et AP-1 dans l'activation du promoteur AT₁ et donc probablement dans l'expression élevée du récepteur AT₁ cardiaque dans certaines pathologies du système cardio-vasculaire (Herzig et al., 1997). Récemment, l'équipe de Dzau démontrait dans un modèle de souris transgéniques, que la surexpression sélective et spécifique des récepteurs AT₁ dans les cardiomyocytes induisait une hypertrophie cardiaque dans les quelques semaines suivant la naissance (Hein et al., 1997a). Finalement, il ne faut oublier le rôle important de l'Ang II dans la resténose post-angioplastie chez le rat. Effectivement, des inhibiteurs de l'ACE ou un antagoniste AT₁ peuvent prévenir ou atténuer le développement de l'hyperplasie néointimale chez le rat (Powell et al., 1989; Laporte et Escher, 1992). Cet effet n'est pas relié aux effets hémodynamiques de l'inhibiteur de l'ACE ou de l'antagoniste AT₁ puisque l'utilisation de bloqueurs des canaux calciques voltage-dépendants n'empêchent pas le développement de la néointima, en dépit d'une réduction comparable de la pression sanguine (Dzau et Pratt, 1993).

Dans le but de comprendre et d'étudier l'implication de l'Ang II sur la croissance de certains types cellulaires, plusieurs études ont été et sont encore effectuées *in vitro* sur des cellules en culture. Ainsi, cette hormone est un mitogène pour les fibroblastes cardiaques de rat et les cellules du cortex surrénalien bovin (Natarajan et al., 1992; Clynes et al., 1993; Sadoshima et Izumo, 1993; Schorb et al., 1993). On note également un faible effet mitogénique de l'Ang II dans des CMLV provenant de rat SHR (rats génétiquement hypertendus) (Paquet et al., 1990; Stouffer et Owens, 1992). Cependant, que ce soit dans les fibroblastes cardiaques ou les cellules du cortex surrénalien, les effets mitogéniques de l'Ang II sont très faibles comparés à l'effet prolifératif d'un "vrai" mitogène, comme par exemple le PDGF. Ce dernier peut augmenter le taux de synthèse d'ADN de 50 à 100 fois la valeur contrôle alors que l'Ang II, dans le meilleur des cas, l'augmente de 3 fois (Natarajan et al., 1992; Clynes et al., 1993; Sadoshima et Izumo, 1993; Schorb et al., 1993). Bien que l'effet de l'Ang II sur la synthèse d'ADN soit faible, il semble néanmoins que ce peptide induit la division cellulaire après 24 heures de traitement (Sadoshima et Izumo, 1993). Par contre, dans les cellules mésangiales, les cellules du tubule proximal, les myocytes cardiaques et les CMLV provenant de l'aorte, plusieurs études démontrent l'absence d'effets directs de l'Ang II sur la division cellulaire (Schelling et al., 1991; Pratt et Dzau, 1993). L'équipe de Molloy a cependant démontré que l'Ang II induisait une synthèse d'ADN dans les CMLV et ce, de façon significative après 48 heures de stimulation (encore là, un facteur de 2-3 par rapport au contrôle) (Weber et al., 1994a;

Weber et al., 1994b). Cet effet mitogénique retardé de l'Ang II est cependant très faible comparé à l'effet d'un mitogène complet comme le PDGF-BB. Il a été démontré de plus que l'Ang II induit la production de facteurs de croissance comme la chaîne A du PDGF, le *transforming growth factor* (TGF)- β 1 et le bFGF dans les CMLV (voir plus bas, section des gènes tardifs) (Naftilan et al., 1989a; Hahn et al., 1991; Gibbons et al., 1992; Itoh et al., 1993). Ceux-ci peuvent donc avoir, par autocrinie, un certain potentiel mitogénique sur ces cellules, d'où un effet indirect de l'Ang II sur la synthèse d'ADN et la division cellulaire. En accord avec ces résultats, l'équipe de Schwartz démontrait récemment, par l'injection d'anticorps neutralisant contre le bFGF, que les effets de l'Ang II sur la resténose post-angioplastie chez le rat (voir paragraphe précédent) est totalement dépendante de la sécrétion de ce mitogène par l'Ang II (Su et al., 1998). À la lumière de ces résultats, plusieurs groupes, dont le nôtre, s'accordent sur le fait que l'Ang II n'est pas un mitogène pour les CMLV en culture. Dans ces cellules, l'Ang II a un effet essentiellement hypertrophique, induisant de façon directe une augmentation significative et dose-dépendante de la synthèse protéique globale sans synthèse d'ADN et division cellulaire (Geisterfer et al., 1988; Berk et al., 1989; Giasson et Meloche, 1995).

2.0 Les récepteurs de l'Ang II

2.1 Propriétés pharmacologiques et biochimiques des sous-types de récepteurs de l'Ang II

Le développement récent d'agents pharmacologiques sélectifs pour les sous-types de récepteur de l'Ang II a confirmé les données physiologiques précédentes, suggérant une hétérogénéité dans la population des récepteurs de l'Ang II. Ainsi, l'utilisation d'antagonistes et ligands non-peptidiques de l'Ang II a prouvé, bien avant leur caractérisation moléculaire, l'existence pharmacologique de deux sites majeurs de liaison pour l'Ang II, maintenant connus sous les termes de sous-types de récepteur AT₁ et AT₂ (pour revue voir Timmermans et al., 1993). Les sous-types de récepteurs sont aussi classés selon des bases biochimiques comprenant principalement la sensibilité aux agents réducteurs et leur couplage aux systèmes de seconds messagers. Les critères de classification sont résumés dans le tableau I (page 12). Les récepteurs AT₁ sont bloqués sélectivement par l'antagoniste compétitif losartan ou DUP 753, un biphénylimidazole. Une étude a également démontré que ce ligand agissait en tant qu'agoniste inverse car ce dernier avait la propriété de renverser les actions d'un

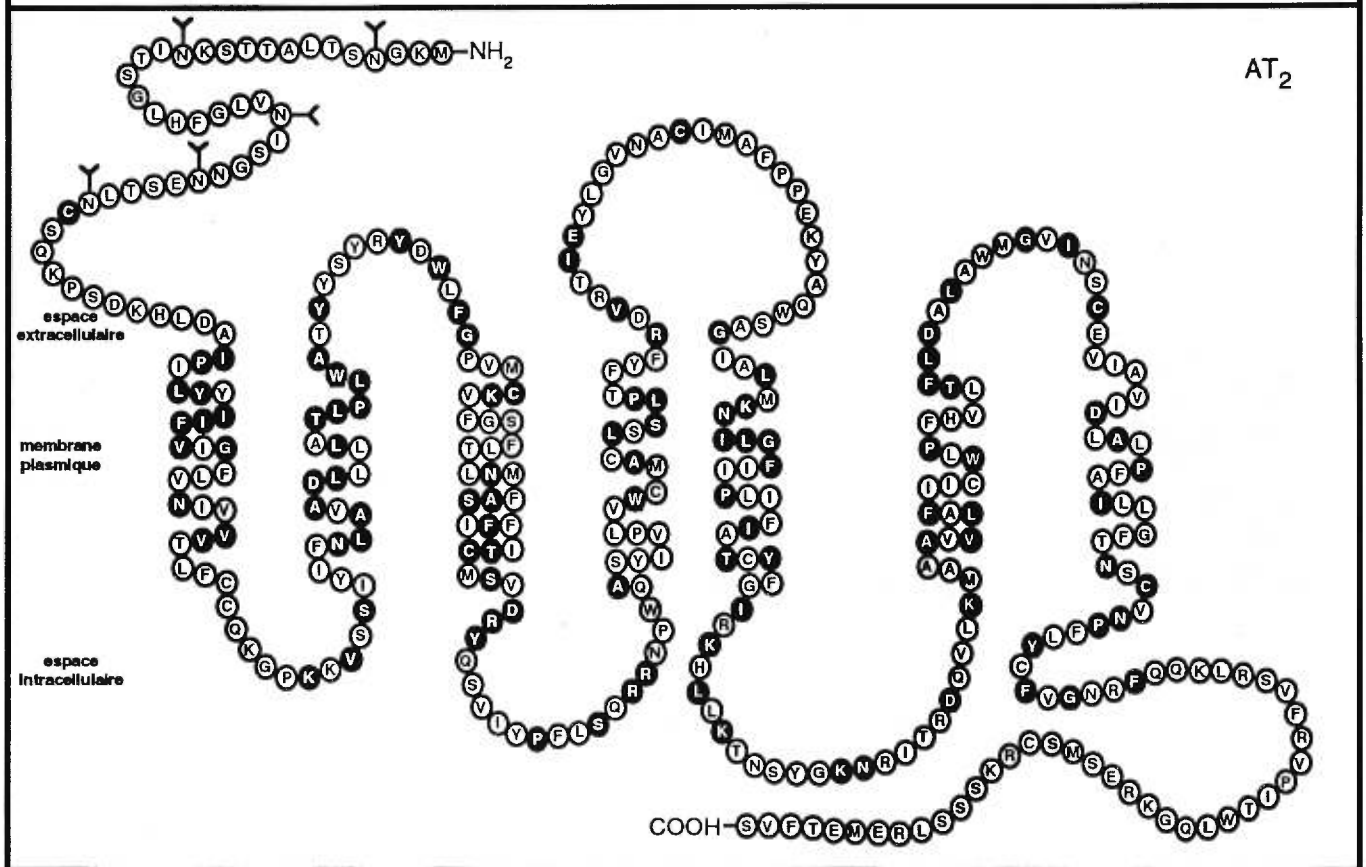
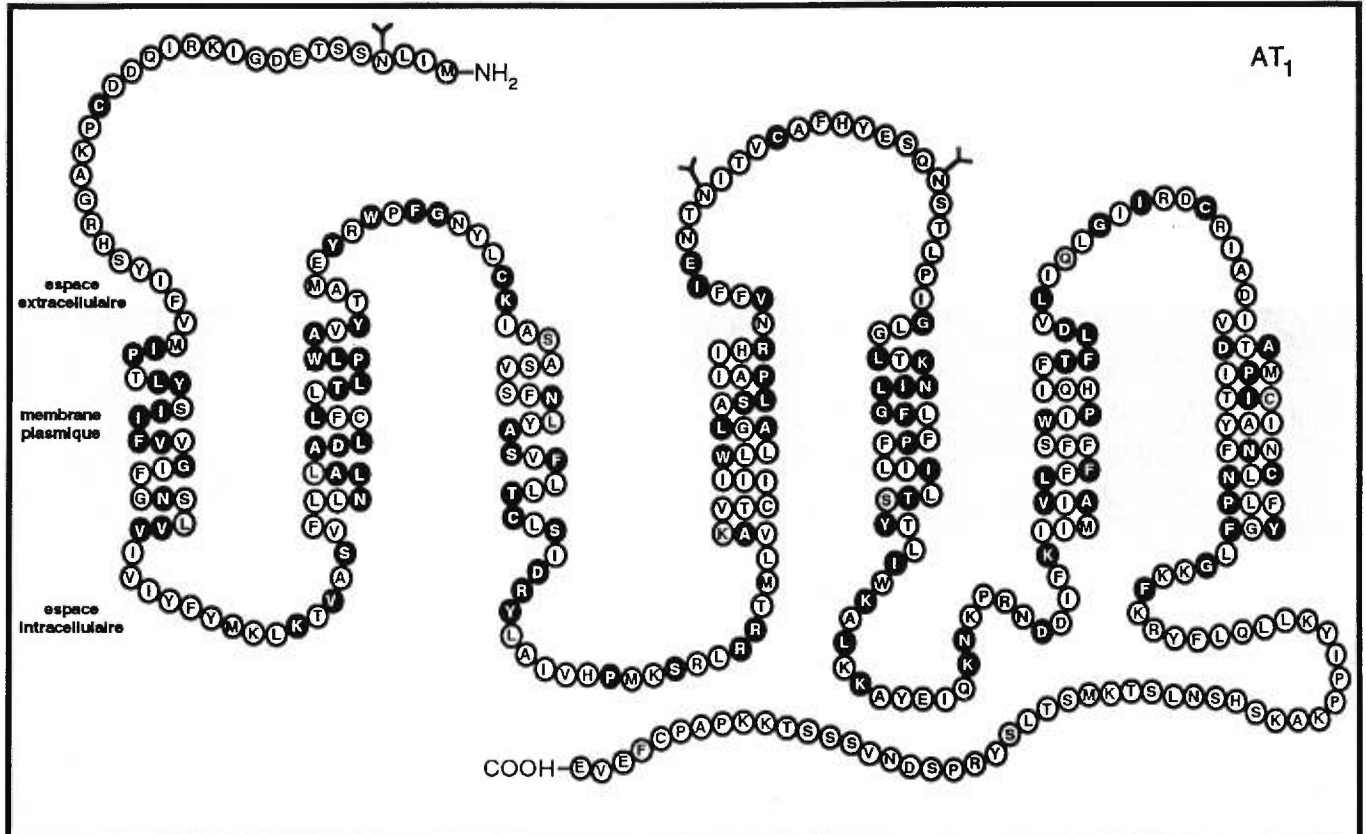
Tableau I: Propriétés pharmacologiques et biochimiques des sous-types de récepteurs de l'Ang II.

	AT ₁	AT ₂
Ordre de puissance	Saralasin > Ang II > Ang III	Ang III ≥ Ang II ≥ Saralasin
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	↓ Adenyl cyclase ↑ PLC ↑ PLA ₂ ↑ PLD ↑ Phosphorylation en tyrosine	↓ cGMP ↑ PLA ₂ ↑↓ Tyrosine phosphatase
Structure	359 acides aminés, 7 domaines transmembranaires	363 acides aminés, 7 domaines transmembranaires
Masse moléculaire	= 60 kDa	≈ 70 kDa

récepteur AT₁ constitutivement activé par une mutation du résidu Asn¹¹¹ en Ala dans la partie transmembranaire 3 (tm3) (Grobowski et al., 1997). L'affinité des récepteurs AT₁ est diminuée lors de l'utilisation d'agents réducteurs (Timmermans et al., 1993). Ces récepteurs possèdent une affinité plus forte pour l'Ang II que pour l'Ang III, un métabolite actif de l'Ang II, et sont couplés à plusieurs voies de signalisation précoces, dont l'activation des phospholipases C (PLC), phospholipase D (PLD) et phospholipase A₂ (PLA₂) (Brock et al., 1985; Griendling et al., 1986; Lang et Vallotton, 1989; Ullian et Linas, 1990; Lassègue et al., 1991; Lassègue et al., 1993), l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (Smith, 1986), et l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Timmermans et al., 1993). Les ligands de la famille des tétrahydroimidazopyridines comme le PD123319 sont quant à eux spécifiques des récepteurs AT₂. Les agents réducteurs comme le dithiothreitol (DTT) n'ont peu ou pas d'effet sur l'affinité de ces derniers, alors que l'Ang III se lie dans un même ordre de puissance que l'Ang II. Pour l'instant, le rôle physiologique des récepteurs AT₂ de même que leur couplage aux protéines G et les voies de signalisation qu'ils activent, sont encore obscurs et controversés et ne feront donc pas l'objet de discussion dans la présente thèse. Cependant, des résultats préliminaires très intéressants provenant de quelques équipes de recherche, dont la nôtre, démontrent des effets anti-prolifératifs relayés par le récepteur AT₂ (Nakajima et al., 1995; Stoll et al., 1995; Gingras et Meloche, résultats non-publiés).

Les premiers clonages moléculaires des gènes codant pour les récepteurs AT₁ en 1991 (Murphy et al., 1991; Sasaki et al., 1991) et AT₂ en 1993 (Kambayashi et al., 1993; Mukoyama et al., 1993) révélèrent que ces récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Fig. 2, page 15) dont la caractéristique principale est le couplage aux protéines liant le GTP (protéines G). Suite au clonage du récepteur AT₁ bovin et de rat, un second isoforme, désigné AT_{1B}, était isolé chez la souris et le rat (Iwai et Inagami, 1992; Sasamura et al., 1992). Les deux isoformes du récepteur AT₁ (AT_{1A} et AT_{1B}) sont très semblables, partageant en effet 95% d'homologie au niveau de la séquence protéique. Les gènes codant pour les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B} de rat sont respectivement localisés sur les chromosomes 17 et 2 (Lewis et al., 1993; Szpirer et al., 1993). La séquence codant pour le récepteur AT₁ humain est également connue (Furata et al., 1992) et contrairement aux rongeurs, le génome humain ne contient apparemment qu'un seul gène codant pour le récepteur AT₁, localisé sur le chromosome 3q21-3q25 (Curnow et al., 1992). Les ADNc du récepteur AT₁ provenant de plusieurs espèces de mammifères dont le lapin (Burns et

Figure 2: Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II. Les séquences des sous-types AT₁ et AT₂ des récepteurs humains de l'Ang II sont représentées. Les résidus identiques entre les deux protéines sont indiqués par des cercles noirs. Les sites de N-glycosylation sont représentés par le signe Y.



al., 1993), le cochon (Itazaki et al., 1993) et le chien (Burns et al., 1994) ont aussi été clonés. Tous ces ADNc codent pour une protéine de 359 acides aminés, d'où une masse moléculaire déduite de 41 kDa. Cependant, la masse moléculaire du produit final est d'environ 65 kDa chez le rat (Desarnaud et al., 1993) et 56 kDa pour le récepteur AT₁ humain exprimé de façon stable dans des fibroblastes de rat (Rat1-AT₁, résultats non-publiés). Cette augmentation importante de la masse moléculaire serait attribuable à la glycosylation du récepteur AT₁ puisque des procédés chimiques ou enzymatiques de déglycosylation permettent de retrouver un récepteur avec une masse moléculaire de 40 kDa (Desarnaud et al., 1993). De plus, il existe trois sites consensus pour la N-glycosylation sur le domaine extracellulaire (Fig. 2). Il semble cependant que la glycosylation du récepteur AT₁ ne soit pas nécessaire à la liaison de l'Ang II puisque la mutation des résidus asparagine en résidus acide aspartique n'a aucun effet sur l'affinité du récepteur (Yamano et al., 1992). Les quatre régions extracellulaires contiennent aussi des résidus cystéine et leur mutation en résidus glycine réduit considérablement l'affinité du récepteur AT₁ pour l'Ang II (Yamano et al., 1992). Ces observations suggèrent que les résidus cystéine sont intimement impliqués dans les interactions récepteur-ligand, fournissant ainsi une explication moléculaire à la sensibilité du récepteur AT₁ aux agents réducteurs.

Le récepteur AT₂, dont l'ADNc a été cloné, initialement chez le rat (Kambayashi et al., 1993; Mukoyama et al., 1993) puis chez la souris (Nakajima et al., 1993) et l'Homme (Tsuzuki et al., 1994), présente une séquence de 363 acides aminés avec un poids moléculaire de 41,3 kDa. Cette séquence est hautement homologue (93%) entre les rongeurs et l'Homme. Par la technique d'hybridation *in situ*, notre laboratoire a cartographié le gène AT₂ humain sur le chromosome X dans la région q22-q23 (Chassagne et al., 1995). La plupart des modifications de séquence entre le récepteur AT₂ humain et celui des rongeurs se situent dans le domaine extracellulaire hydrophile N-terminal de la protéine, touchant 42% des acides aminés. En dépit de ce fort degré d'hétérogénéité dans le domaine N-terminal, cinq sites consensus de N-glycosylation restent conservés (Fig. 2), suggérant un mécanisme post-traductionnel de régulation commun du récepteur AT₂ entre ces espèces. La variabilité du poids moléculaire du récepteur AT₂ selon les tissus ou les cellules serait, comme pour le récepteur AT₁, attribuable à divers degrés de glycosylation sur ces sites (Servant et al., 1996).

La séquence du récepteur AT₂ est faiblement analogue à celle du récepteur AT₁, avec 30 à 35% de résidus identiques (Fig. 2). Toutefois, les récepteurs AT₁ et AT₂ contiennent des séquences et des résidus très conservés qui sont susceptibles d'être impliqués dans la liaison du ligand et le couplage aux protéines G. Parmi eux, il existe deux groupes de six acides aminés présents dans les domaines transmembranaires (tm), le premier (Thr-Leu-Pro-Leu-Trp-Ala) dans le tm2, et le second (Lys-Asn-Ileu-Leu-Gly-Phe) dans le tm5 et dans lequel le résidu lysine est crucial pour la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ (Yamano et al., 1992; Monnot et al., 1996). De façon plus précise, il a été démontré que des résidus bien spécifiques, tels que la Tyr²⁹² étaient essentiels pour le couplage adéquat du récepteur AT₁ aux protéines G et à l'activation de la PLC (Marie et al., 1994). D'autres résidus, tels le motif (Asp-Arg-Tyr) au début de la seconde boucle intracellulaire, de même que l'Asp⁷⁴ dans le tm2, le résidu Ser¹¹⁵ dans le tm3 et la Tyr³⁰² à la fin du tm7, sont tous essentiels au couplage adéquat du récepteur AT₁ aux protéines G (Laporte et al., 1996; Monnot et al., 1996), et sont aussi retrouvés dans le récepteur AT₂. Pourtant, en dépit de ces conservations, le mode de couplage du récepteur AT₂ semble atypique, différent de celui des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Bottari et al., 1991; Kambayashi et al., 1993; Mukoyama et al., 1993; de Gasparo et al., 1994; Mukoyama et al., 1995; Nahmias et al., 1995; Nahmias et Strosberg, 1995).

2.2 Distribution tissulaire des sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂

Les deux isoformes du récepteur AT₁ chez les rongeurs (AT_{1A} et AT_{1B}) sont pharmacologiquement non distinguables. Cependant, les techniques de biologie moléculaire ont permis d'apprécier la distribution de ces deux isoformes. Ainsi, le récepteur AT_{1A} est la forme prédominante dans plusieurs tissus, incluant les reins, les poumons, les ovaires, les testicules, le coeur, le foie et le muscle lisse vasculaire. De surcroît, les CMLV (dérivés du muscle lisse vasculaire) expriment à leur surface exclusivement l'isoforme AT_{1A} (pas d'isoformes AT_{1B} ni AT₂) avec un nombre maximal de sites dans l'ordre de 1.0 pmol/mg de protéines (Servant et Meloche, résultats non-publiés). Le récepteur AT_{1B} est pour sa part exprimé surtout au niveau de la glande surrénale, de l'utérus et de l'hypophyse antérieure (Kitami et al., 1992; Kakar et al., 1992a; Kakar et al., 1992b). Chez l'humain, la distribution des sous-types de récepteur de l'Ang II varie également entre différents tissus ou organes. Ainsi, les récepteurs AT₁ sont retrouvés surtout dans les tissus vasculaires incluant l'aorte, les artères pulmonaires et rénales et la microvascularisation. On le retrouve aussi au niveau

du coeur, du cortex rénal et surrénalien, du foie, de l'utérus, des poumons, et du cerveau. La distribution du récepteur AT₂ est plus restreinte chez l'adulte et se retrouve surtout au niveau de l'appareil reproducteur féminin (myomètre utérin, trompes de Fallope et ovaires), de la médullosurrénale, du coeur, et de régions bien définies du cerveau (Timmermans et al., 1993; de Gasparo et al., 1994). Cette localisation spécifique, associée au fait que certaines réponses à l'Ang II telles les sécrétions de prolactine et d'hormone lutéinisante, la dilatation des artérioles cérébrales ou la dyspnée chez le rat sont inhibées *in vitro* par des antagonistes spécifiques du sous-type AT₂, suggèrent que ce dernier joue un rôle dans les fonctions cérébrales et de reproduction de l'adulte (Timmermans et al., 1993; de Gasparo et al., 1994). Des études récentes utilisant des souris transgéniques nulles pour le locus AT₂ (voir plus bas) démontrent cependant que les femelles homozygotes *-/-* sont fertiles (Ichiki et al., 1995) indiquant ainsi un rôle accessoire ou voir même inexistant des récepteurs AT₂ dans la fonction de reproduction *in vivo*. En accord avec l'utilisation des antagonistes, ces souris ont cependant des troubles de comportements et une diminution de la dyspnée (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995).

2.3 Désensibilisation des récepteurs

Nous avons vu plus haut que l'Ang II circulant a un temps de demi-vie très court (10 à 20 secondes) et cela du à la présence de protéases (angiotensinases) produisant des fragments inactifs (voir Fig. 1). Ce processus permet donc de contrôler la durée d'action de l'agoniste aux sites spécifiques. L'organisme s'est doté d'un autre mécanisme permettant également de contrôler la durée d'action de l'Ang II, mais cette fois-ci, au niveau récepteuriel.

2.3.1 Définitions et exemples

Une caractéristique biochimique importante des récepteurs à sept passages transmembranaires est la désensibilisation récepteurielle. Appelée aussi tolérance ou tachyphylaxie, la désensibilisation survient lorsque des cellules sont exposées de façon répétitive ou chronique à un agent stimulant et s'exprime par une diminution de la sensibilité ou de l'efficacité des cellules à répondre à ce même stimulus. Lors d'études *in vitro*, selon le système utilisé, cette tolérance apparaît après de courtes ou de longues périodes d'exposition à de fortes concentrations d'un agent stimulant. *In vivo*, ce phénomène naturel d'adaptation se rencontre dans plusieurs systèmes. Dans le système

visuel par exemple, le récepteur stimulé par les ondes lumineuses (récepteur rhodopsine) est rapidement inactivé (< 0.5 sec) suivant une stimulation lumineuse, ceci dans le but d'interpréter une très brève stimulation lumineuse comme un flash et non comme une illumination continue. La désensibilisation peut se développer suite à la sur-utilisation de médicaments ou drogues. Cette désensibilisation aux médicaments est un facteur majeur qui diminue l'efficacité et la durée d'action de plusieurs agents thérapeutiques, comme les agonistes β -adrénergiques utilisés lors d'insuffisance cardiaque. Ce processus d'adaptation cellulaire qu'est la désensibilisation intéresse donc plusieurs équipes de recherche à cause de ses implications biochimiques et pharmacologiques et de ses conséquences thérapeutiques.

La désensibilisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires implique certaines réactions biochimiques incluant le découplage entre le récepteur et la protéine G, la séquestration ou internalisation du récepteur et la régulation négative ou "downregulation" du récepteur (Böhm et al., 1997). Les phénomènes de découplage et de séquestration sont très rapides (secondes à minutes) après l'activation des récepteurs et ils sont réversibles, alors que la régulation négative, qui est irréversible, survient lors de stimulations prolongées (heures) (Böhm et al., 1997). Le découplage des récepteurs se fait essentiellement par la phosphorylation de ceux-ci par des sérine/thréonine kinases bien spécifiques. Tout d'abord, des kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK_s) sont impliquées dans la désensibilisation homologue. Ces kinases phosphorylent les récepteurs, principalement la queue carboxy-terminale, uniquement lorsque ceux-ci sont occupés par leur ligand respectif. En second lieu, les kinases dépendantes des seconds messagers, comme les protéines kinases C (PKC) et A (PKA), sont quant à elles impliquées dans la phosphorylation des récepteurs indépendamment de la présence du ligand. Ces kinases phosphorylent des sites se retrouvant dans les boucles intracellulaires et la queue carboxy-terminale et sont responsables des désensibilisations homologues mais également hétérologues. Le modèle classique d'étude de désensibilisation, le récepteur β_2 -adrénergique, implique également des protéines masquantes, les arrestines, dans la désensibilisation suivant une phosphorylation par les GRK_s. Les arrestines se lient aux sites phosphorylés sur la queue carboxy-terminale, empêchant ainsi un couplage entre les récepteurs et les protéines G (Böhm et al., 1997). Comme le prédit le modèle ternaire des récepteurs couplés aux protéines G (ligand-récepteurs-protéines G), les récepteurs découplés des protéines G ont une affinité diminuée pour leur ligand respectif (récepteurs de basse affinité) alors que les récepteurs couplés ont une forte affinité pour le ligand (récepteurs

de haute affinité) (De Léan et al., 1980). La perte de réponse observée après une désensibilisation rapide d'un système récepteur à sept passages transmembranaires-protéines G résulte de deux événements biochimiques successifs : 1) un découplage fonctionnel, rapide et réversible entre le récepteur et la protéine G suivi de 2) l'apparition de sites de basse affinité. La séquestration et la régulation négative font toutes deux intervenir des processus d'internalisation des récepteurs dans différents types de vésicules. Par l'action des mécanismes de triage sur ces vésicules, les récepteurs internalisés seront recyclés à la membrane plasmique ou emprunteront la voie de dégradation dans les lysosomes. Ces processus biochimiques sont donc tous impliqués dans la réponse finale d'une hormone se liant à son récepteur à sept passages transmembranaires et ont été caractérisés pour le sous-type AT₁.

2.3.2 Désensibilisation rapide du récepteur AT₁: découplage et séquestration

Récemment, l'équipe de Lefkowitz a démontré, dans un système reconstitué (surexpression des récepteurs AT₁ ainsi que des GRK_s 2,3 et 5 dans les cellules HEK293), que le récepteur AT₁ était phosphorylé par des GRK_s et la PKC suite à une stimulation par l'Ang II (Oppermann et al., 1996). Ceci corrélait avec une perte importante de la réponse, indiquant ainsi que la phosphorylation de ce récepteur est sûrement impliquée dans les phénomènes de désensibilisation rapide. En accord avec ces résultats, les équipes de Alexander et Griendling ont démontré dans un système plus physiologique, les CMLV de rat, que les GRK_s 2 et 5 étaient exprimées dans ces cellules et que l'Ang II modulait significativement l'expression de GRK5. De plus, cette dernière serait responsable, en partie, de la phosphorylation du récepteur AT₁ lors de la liaison avec l'Ang II, et le tout serait suivi d'une baisse importante de l'activation de la PLC (Ishizaka et al., 1996; Ishizaka et al., 1997). Ces résultats ne sont cependant que très préliminaires car ils ne relèvent que de corrélations entre le récepteur phosphorylé, la présence des GRKs dans les CMLV et une perte de réponse. D'autres études, où par exemple l'activité kinase des GRK_s sera étudiée suite à une stimulation par l'Ang II et où les sites de phosphorylation des GRK_s dans le récepteur auront été mutés, seront nécessaires afin de vérifier le rôle des GRK_s dans les phénomènes de désensibilisation rapide du récepteur AT₁ dans les CMLV ou dans d'autres types cellulaires.

L'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G, qui est la voie majeure d'internalisation, fait intervenir la formation de "coated pits" résultant d'une interaction entre les récepteurs, les protéines adaptines et la clathrine (Sorkin et Waters, 1993). Il a été démontré, dans les CMLV, que la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ induit l'aggrégation et l'internalisation des complexes ligand-récepteur (Peach, 1981). Plusieurs études ont effectivement caractérisé ces phénomènes d'internalisation. Ainsi, il a été démontré que suivant une stimulation des CMLV par l'Ang II, les récepteurs AT₁ s'aggrègent en "coated pits", que 50% des récepteurs AT₁ sont séquestrés après seulement 1.5 minutes de stimulation et que ces complexes hormone-récepteur séquestrés ont toujours la propriété de transmettre des signaux (Griendling et al., 1987; Anderson et al., 1992). Ce dernier résultat de même que des études portant sur l'internalisation du β_2 AR suggèrent que la séquestration des récepteurs n'est pas toujours responsable d'une diminution de la réponse. Ainsi, l'internalisation serait également importante pour les phénomènes de réversibilité ou de resensibilisation du système. En effet, des études récentes ont démontré la présence de phosphatases associées aux vésicules contenant le récepteur β_2 AR séquestré. Ces phosphatases déphosphoryleraient le récepteur qui avait été préalablement phosphorylé (découplé) au niveau de la membrane plasmique. Ce mécanisme de séquestration serait donc une voie possible de resensibilisation rapide du système désensibilisé (Yu et al., 1993). Plusieurs équipes ont étudié les motifs du récepteur AT₁ susceptibles d'être impliqués dans son internalisation. La troisième boucle intracellulaire ainsi que la queue carboxy-terminale des récepteurs couplés aux protéines G contiennent des séquences essentielles pour les processus d'internalisation (Savarese et Fraser, 1992; Hunyady et al., 1994a). L'équipe de Catt a démontré que le motif Ser-Thr-Leu, situé dans la partie carboxy-terminale du récepteur AT₁, est essentiel pour l'endocytose des complexes hormone-récepteur (Hunyady et al., 1994b). L'absence de motif dans le récepteur AT₂ pourrait expliquer en partie l'incapacité de ce récepteur à être internalisé suite à une stimulation par l'Ang II (Dudley et al., 1991; Hunyady et al., 1994b; Hein et al., 1997b). En accord avec ces résultats, l'équipe de Baker a démontré que l'expression d'un récepteur AT₁ tronqué en c-terminal (délétion de la queue cytoplasmique après la Leu³¹⁴) produit un récepteur fonctionnel (couplé aux protéines G), dont la stimulation provoque une désensibilisation rapide du système sans aucune internalisation réceptorielle (Thomas et al., 1995). Ces résultats mettent en évidence quatre points importants: 1) la partie c-terminale du récepteur AT₁ est essentielle au processus d'internalisation; 2) la partie c-terminale, du moins à partir de la Leu³¹⁴, est peu ou pas impliquée dans le couplage aux protéines G (du moins G_q, dans ce modèle). Des résultats récents indiquent

effectivement un rôle important de la troisième boucle intracellulaire dans cette fonction (Conchon et al., 1997); 3) cette délétion en c-terminal donne lieu à l'expression d'un récepteur dont les sites potentiels de phosphorylation par les GRK_s/PKC/PKA ont été enlevés presque en totalité (il reste cependant quatre résidus sérine et thréonine dans la première et la seconde boucles intracellulaires) et donc que la désensibilisation rapide de ce récepteur n'est pas classique, car elle ne fait pas intervenir des phosphorylations en c-terminal comme pour ce qui est du β_2 AR; 4) une désensibilisation rapide d'une réponse par un récepteur couplé aux protéines G n'implique pas nécessairement la séquestration de celui-ci.

La séquestration des récepteurs AT₁ pourrait également avoir un rôle dans la dégradation de son ligand naturel, l'Ang II. En effet, l'équipe de Kobilka démontrait récemment, en utilisant des techniques d'immunofluorescence, que le sous-type AT₁ transfecté de façon stable dans les cellules embryonnaires humaines d'origine rénale (cellules 293) subissait une endocytose suite à une brève exposition à l'Ang II. Suivant cette internalisation du complexe ligand-récepteur, l'Ang II intracellulaire était dirigée vers la voie lysosomale alors que le récepteur était recruté de nouveau à la membrane plasmique suite au retrait de l'agoniste (Hein et al., 1997b). Il semble que cette transition dynamique et continue entre le récepteur membranaire (à la surface des cellules) et le complexe ligand-récepteur intracellulaire atteigne un équilibre de sorte qu'aucun changement du nombre de sites n'est détecté par une simple expérience de liaison. À l'équilibre, il y a toujours un nombre identique de récepteurs à la surface des cellules, mais l'Ang II continue d'entrer de façon active dans la cellule par le biais des récepteurs AT₁ et emprunte la voie de dégradation (Hein et al., 1997b). Il est à noter également que ce processus d'internalisation persiste même lorsque les mécanismes de désensibilisation rapides ont atténué la libération interne de Ca²⁺ et la production d'inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) indiquant, comme cela a été mentionné plus haut, que des mécanismes distincts semblent moduler la désensibilisation et l'internalisation réceptorielle.

2.3.3 Désensibilisation à long terme du récepteur AT₁: régulation négative

La régulation négative ou "downregulation" des récepteurs à sept domaines transmembranaires se caractérise par une diminution importante de la réponse cellulaire, en corrélation avec une perte de l'expression des récepteurs membranaires. Cette

régulation négative peut donc se faire à plusieurs niveaux. Ainsi, le temps de demi-vie du récepteur, donc le temps d'expression du récepteur membranaire, peut être diminué par 1) une augmentation de l'activité des mécanismes impliqués dans la dégradation de ceux-ci, 2) une diminution spécifique ou générale de l'activité de la machinerie traductionnelle impliquée dans la synthèse des récepteurs à partir des ARNm, 3) une déstabilisation des ARNm codant pour les récepteurs (leur temps de demi-vie peut être effectivement diminué) et finalement 4), une diminution de l'activité de la machinerie transcriptionnelle impliquée dans la synthèse des ARNm à partir des gènes codant pour ces récepteurs.

La régulation négative des récepteurs AT₁ suivant une exposition de longue durée à l'Ang II est pour l'instant encore peu documentée. Cependant, une étude démontre que suivant une exposition de 6 heures avec une concentration de 1.0 µM d'Ang II, le niveau des ARNm du récepteur AT₁ est fortement diminué dans les cellules glomérulaires mésangiales (Makita et al., 1992). Cette désensibilisation, qui fait intervenir une régulation négative des récepteurs AT₁, est dépendante de l'Ang II, donc homologue, et elle semble être dépendante de l'activité de la PKC. Cette même étude démontre que la forskoline, le dibutyryl cAMP et la *toxine du choléra*, qui sont tous des agents mimant ou faisant augmenter de façon importante la concentration intracellulaire en AMPc, produisent également une diminution de l'expression des messagers codant pour le récepteur AT₁. Bien que nous n'ayons pas étudié l'expression des ARNm codant pour AT₁, nous avons observé ce type de désensibilisation hétérologue dans les CMLV suivant une stimulation prolongée avec l'IBMX (un inhibiteur des phosphodiésterases) et la forskoline (un activateur de l'adénylyl cyclase) sur l'expression des récepteurs AT₁ (Giasson et al, résultats non-publiés). Récemment, l'équipe de Murphy a caractérisé les effets de la forskoline, dans les CMLV, sur la régulation négative des récepteurs AT₁. Une élévation importante de la teneur en AMPc conduit effectivement à une baisse de l'expression des ARNm sans pour autant noter une baisse de l'activité transcriptionnelle du gène codant pour AT₁, mesurée par "nuclear run-on". C'est plutôt une voie PKA-dépendante qui serait impliquée dans la déstabilisation des ARNm codant pour le récepteur AT₁ (Wang et al., 1997). D'autres phénomènes de désensibilisation hétérologue semble impliqués dans la régulation de l'expression de ce récepteur. Ainsi, des stimulations prolongées (de 4 à 24 heures) des CMLV avec l'EGF, le bFGF et le PDGF-BB réduisent de façon drastique le niveau des ARNm codant pour le récepteur AT₁. Cette réduction des ARNm serait due à l'activation de mécanismes impliqués dans une diminution de la

transcription du gène codant pour le récepteur AT₁ mais également dans des procédés post-transcriptionnels menant à une déstabilisation des ARNm (Nickenig et Murphy, 1994).

2.4 Caractéristiques des souris transgéniques nulles au locus des gènes AT₁ et AT₂

Comme prévue, les souris transgéniques nulles au locus du gène AT_{1A} (AT_{1A} -/-) sont hypotendues et souffrent d'hyper-réninémie (plus de boucle rétroactive négative de l'Ang II sur la production de rénine par les cellules juxtaglomérulaires rénales, voir plus haut) (Sugaya et al., 1995). Cependant, des anomalies physiologiques plus importantes sont rencontrées chez les souris transgéniques nulles au locus du gène de l'angiotensinogène (Agt -/-), le précurseur de l'Ang I (voir figure 1). En effet, en plus d'une hypotension sévère, ces dernières présentent, en outre, un retard important de la croissance (faible gain de poids après la naissance), un taux de survie ex-utero diminué et des anomalies morphologiques importantes au niveau rénale (Tanimoto et al., 1994; Kim et al., 1995a; Niimura et al., 1995). Or les différences observées entre ces deux groupes de souris pourraient s'expliquer de trois façons: -les anomalies physiologiques sont moins nombreuses et importantes chez les souris AT_{1A} -/- car il y a présence 1) d'un autre sous-type AT_{1B} chez les rongeurs (voir plus haut); 2) présence du récepteur AT₂; 3) présence d'un récepteur répondant à l'Ang II mais n'étant pas encore caractérisé. La publication récente d'une étude effectuée avec des souris transgéniques nulles pour les deux locus des gènes AT_{1A} et AT_{1B} permet maintenant de répondre à cette hypothèse car ces souris AT_{1A} -/-, AT_{1B} -/- ont des caractéristiques phénotypiques identiques aux souris Agt -/- (Tsuchida et al., 1998).

D'autre part, l'hypothèse d'une implication du récepteur AT₂ dans l'apoptose et dans des effets antiprolifératifs sur la croissance de certains types cellulaires, dont les CMLV, (Nakajima et al., 1995), est en contradiction avec la description récente des souris transgéniques nulles au locus du gène AT₂. En effet, ces études ont démontré que l'inactivation du gène AT₂ n'induit ni dysfonctionnement, ni modifications tissulaires au cours du développement embryonnaire. Les seules modifications importantes sont une diminution générale de l'activité motrice et une sensibilité accrue à l'effet vasopresseur de l'Ang II (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). Ce dernier résultat indique que pour certains effets de l'Ang II, en particulier les effets vasopresseurs, les voies de signalisation stimulées par le sous-type AT₂ semble agir en

tant qu'antagonistes physiologiques des effets relayés par le sous-type AT₁. En accord avec cette hypothèse, des résultats récents démontrent que la surexpression spécifique du sous-type AT₂ dans le tissu cardiaque de souris inhibe les effets presseurs et chronotropiques relayés par l'activation du sous-type AT₁ (Masaki et al., 1998).

3.0 Les bases moléculaires de l'action hypertrophique de l'Ang II dans les CMLV

La section qui suit résume les connaissances actuelles des mécanismes de signalisation impliqués dans les effets trophiques de l'Ang II. Bien que quelques tableaux soient disponibles, il est fortement conseillé de se référer à la figure 3, page 27 afin de visualiser les différentes voies de signalisation, les inhibiteurs pharmacologiques disponibles pour certaines kinases et les mécanismes d'inter-relations qui existent entre les différentes voies.

3.1 Implication importante des machineries transcriptionnelle et traductionnelle

L'importance des actions physiologiques de l'Ang II au niveau de l'homéostasie hydrosodique et de la pression sanguine sont à elles seules des raisons importantes qui justifient des études fondamentales afin d'identifier les voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'obtention d'une réponse spécifique. Cependant, l'implication de l'Ang II dans la génèse et le maintien de certaines pathologies du système cardiovasculaire (voir plus haut) justifie encore d'avantage les recherches fondamentales et cliniques, premièrement du fait de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires dans les pays industrialisés mais également par les frais hospitaliers qu'engendre le traitement de ces maladies. Notre laboratoire s'intéresse à l'aspect fondamental des actions hypertrophiques de l'Ang II dans les CMLV, donc à l'identification des voies de signalisation activées par l'Ang II et impliquées dans l'obtention d'un phénotype hypertrophique. Les bases moléculaires de l'action hypertrophique de ce peptide dans les CMLV restent à définir. L'induction de la synthèse protéique par l'Ang II est relayée par le récepteur AT₁ et elle est associée à une augmentation sélective du contenu cellulaire en protéines contractiles, en protéines de la matrice extracellulaire et du cytosquelette ainsi qu'en protéines des machineries traductionnelle et de maturation (folding machinery) incluant en outre: l' α -actine, la thrombospondine, le collagène, les HSP 60 et 70, la calréticuline, le facteur

Figure 3. Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteur AT₁. La liaison de l'Ang II au récepteur AT_{1A} des CMLV active plusieurs effecteurs cellulaires par l'intermédiaire d'au moins deux classes de protéines G, soit Gq et Gi. L'augmentation de la concentration intracellulaire des seconds messagers conduit à l'activation de plusieurs cascades de protéines kinases qui agissent de façon synergique pour augmenter la vitesse de synthèse globale des protéines. L'effet hypertrophique de l'Ang II se manifeste par des changements au niveau de la transcription des gènes et de la vitesse de traduction des ARNm. Les flèches en pointillé indiquent que le nombre et la nature des intermédiaires est inconnu. Les sérine/thréonine kinases et les kinases à double spécificité MEK 1/2 sont représentées en bleu-gris, les tyrosine kinases cytoplasmiques en bleu-marine, le facteur d'échange guanylique SOS et les protéines adaptatrices en jaune, les protéines membranaires en mauve, les facteurs de transcription en vert, les facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction en turquoise et les différents inhibiteurs pharmacologiques en rouge. Les ribosomes sont représentés par les sous-unités 40S/60S et la protéine Gq par le complexe hétérotrimérique $\alpha\text{q}-\beta-\gamma$. La protéine Gi, l'adénylyl cyclase, les phospholipases D et A₂, l'échangeur Na⁺/H⁺, la CAM/kinase II, de même que les phosphatases ne sont pas présentés sur ce schéma par manque d'espace. Abréviations: PTK, protéines tyrosine kinases; pour le reste se référer au texte ou à la liste en début de thèse.

d'élongation 1B, la disulfide isomérase et la vimentine (Turla et al., 1991; Patton et al., 1995). L'augmentation de l'expression de certaines de ces protéines (du moins pour l' α -actine, la thrombospondine et le collagène) est concomitante à une augmentation des ARNm codant pour ces dernières, suggérant ainsi que des changements au niveau transcriptionnel contribuent de façon importante à la stimulation globale de la synthèse protéique par l'Ang II dans les CMLV. Dans un même ordre d'idée, des résultats récents démontrent que l'Ang II, probablement par la phosphorylation du facteur de transcription *Upstream Binding Factor* (UBF), induit une augmentation de l'expression de l'ARN ribosomal (ARNr) 18S dans les CMLV, suggérant ainsi un mécanisme transcriptionnel par lequel ce peptide induit l'expression d'ARN impliqués dans la régulation de la machinerie traductionnelle (Hershey et al., 1995). Des études récentes démontrent également que l'Ang II exerce des effets sur le niveau de phosphorylation des composantes de la machinerie traductionnelle (voir aussi plus bas, section sur la PI3-kinase). Ainsi, dans les CMLV, l'Ang II induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E, une sous-unité du facteur eIF4F qui sert à lier la coiffe de l'ARNm (Rao et al., 1994a; Voisin et Meloche, manuscrit en préparation). Outre sa régulation par phosphorylation, l'activité de eIF4E est contrôlée par une famille de protéines, appelées *4E-binding proteins* (4E-BP), qui forment un complexe avec eIF4E et inhibent le démarrage de la traduction (Proud et Denton, 1997). Nous avons démontré que la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ stimule la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLV, entraînant ainsi sa dissociation du facteur eIF4E (Fleurent et al., 1997 et voir Fig. 3). L'ensemble de ces observations indique que la stimulation globale de la synthèse protéique, après activation du récepteur AT₁, pourrait résulter de changements tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel. Les voies de signalisation du récepteur AT₁ sont nombreuses et complexes. Nous commençons seulement à comprendre et à apprécier leur implication individuelle et/ou combinée dans la régulation de l'activité des machineries transcriptionnelle et traductionnelle dans les CMLV. En ce sens, nous avons publié récemment un article de revue concernant les voies de signalisation activées par les sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂ et impliquées dans l'effet hypertrophique de l'hormone. Coauteur et responsable de la partie sur la signalisation liée au sous-type AT₁, cette revue est présentée en annexe.

Afin de mieux apprécier et comprendre les voies de signalisation que stimule l'Ang II dans les CMLV, il est possible de les présenter selon un ordre chronologique d'activation, appelé aussi stimulation multiphasique. Ainsi, suivant la liaison de l'Ang

II au récepteur AT₁ il y a premièrement stimulation de la PLC et mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire en quelques secondes, ceci correspondant à la signalisation précoce. Cette première vague de stimulation est suivie d'une stimulation de la PLA₂, de la PLD, des sérine/thréonine et tyrosine kinases, après quelques minutes, ceci correspondant à la signalisation intermédiaire. Finalement, après plusieurs heures de stimulation, l'activation de ces kinases et autres effecteurs induit la transcription de certains gènes. Cette dernière étape est la signalisation tardive.

3.2 Signalisation précoce dans les CMLV: les seconds messagers

Comme mentionné auparavant, la quasi totalité des effets physiologiques de l'Ang II sont relayés par le récepteur AT₁. Bien que les voies de signalisation couplées au récepteur AT₁ sont communes à plusieurs types cellulaires, il semble cependant qu'il existe un phénomène de spécificité au niveau du profil de signalisation dépendant de la réponse physiologique finale requise (sécrétion d'aldostérone par les corticosurrénales, contraction des CMLV, réabsorption du sodium par les cellules des tubules proximaux rénaux, etc...). Dans les CMLV de rat en culture, les récepteurs AT₁ sont couplés positivement à la PLC et négativement à l'adénylyl cyclase par l'intermédiaire des protéines G. Ces enzymes agissent sur des substrats spécifiques pour générer des seconds messagers qui ont la capacité de transformer un signal extracellulaire en une série complexe d'événements biochimiques intracellulaires.

3.2.1 Les seconds messagers dérivés des phospholipides et des nucléotides: l'InsP₃, le diacylglycérol et l'AMPC

Le récepteur AT₁ est couplé à deux familles de protéines G (Bernstein et Berk, 1993). La première, insensible à la toxine de *B.pertussis*, appartient à la famille Gq (Spiegel et al., 1992). Lors de la formation du complexe hormone-récepteur, le complexe hétérotrimérique que forme la protéine Gq est alors dissocié en deux sous-unités, un monomère αq lié au GTP et un dimère βγ. La sous-unité αq ainsi activée conduit à l'activation d'une PLC de type bêta (PLCβ). La PLCβ hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), un phospholipide membranaire de faible abondance, pour générer, de façon rapide (5 à 15 sec) et transitoire, l'InsP₃ et le diacylglycérol (DAG) (Alexander et al., 1985; Griendling et al., 1986; Ullian et Linas, 1990; Leduc et al., 1995a) (voir Fig. 3). Le DAG demeure au niveau membranaire et stimule les PKCs sensibles au DAG (les familles conventionnelle et nouvelle, voir plus

bas) alors que l'InsP₃ diffuse dans le cytoplasme et se lie à un récepteur spécifique situé sur le réticulum endoplasmique, causant ainsi une libération de Ca²⁺ intracellulaire (Brock et al., 1985). Cette augmentation transitoire de Ca²⁺ semble être un élément initiateur d'une série de phénomènes complexes dont l'influx de calcium (Clapham, 1995), lequel provoque une élévation soutenue de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire, et l'activation, en autres, de kinases et phospholipases dépendantes du Ca²⁺ dont les CAM/kinases, la famille classique des PKCs et la PLA₂ (voir plus bas).

Bien que la désensibilisation réceptorielle soit importante dans les processus cellulaires impliqués dans la terminaison d'une réponse (voir plus haut), la sous-unité α des protéines G joue également un rôle primordial. En effet, de par son activité GTPasique intrinsèque, elle permet la transformation rapide du GTP en GDP et ainsi la reformation de l'hétérotrimère α - $\beta\gamma$ et l'arrêt de la réponse précoce (Spiegel et al., 1992). Finalement, une étude récente a suggérée que l'Ang II stimule également la PLC γ , laquelle, contrairement à la PLC β , est activée par phosphorylation sur des résidus tyrosines spécifiques (Marrero et al., 1994). Ces résultats controversés suggèrent que la production d'InsP₃ et de DAG serait la conséquence d'une activation conjointe de la PLC γ et β ou bien seulement de la PLC γ par l'Ang II. Cependant, les résultats d'autres équipes démontrent que la production des seconds messagers semble passer par l'activation d'une PLC dépendante des protéines G comme la PLC β . Ainsi, dans des CMLV perméabilisés, le GTP γ S augmente de façon synergique la production d'InsP₃ par l'Ang II (Socorro et al., 1990). De plus, la désensibilisation ou la régulation négative de la protéine Gq inhibe l'activation d'une PLC par l'Ang II (Kai et al., 1996) impliquant qu'une protéine G de la famille Gq est responsable du couplage entre le récepteur AT₁ et une PLC. Il est cependant possible qu'une tyrosine kinase soit activée par les protéines G et soit responsable de la phosphorylation de la PLC γ . Il est aussi possible qu'une autre isoforme des PLCs soit impliquée dans la génération des seconds messagers, telle que la PLC- δ qui est fortement exprimée dans les tissus vasculaires (Homma et al., 1993).

La seconde famille de protéines G couplée à l'activation du récepteur AT₁ est sensible à la toxine de *B.pertussis* et appartient ainsi à la famille Gi (Spiegel et al., 1992). Cette toxine inhibe effectivement la plupart des protéines G composant la famille Gi (Gt₁, Gt₂, Gi₁, Gi₂, Gi₃ et Go) en induisant l'ADP ribosylation d'un résidu cystéine sur les sous-unités α (Spiegel et al., 1992). Cette modification covalente des sous-unités α a pour conséquence de découpler les protéines G des récepteurs

membranaires empêchant ainsi la dissociation des sous-unités des protéines G (α et $\gamma\beta$). La sous-unité α_i contrôle de façon négative l'activité de l'adénylyl cyclase. Cette dernière catalyse la conversion de l'ATP en AMPc qui est à son tour responsable de l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc ou PKA. Ainsi, une stimulation par l'Ang II abaisse la teneur en AMPc des cellules cibles et donc n'active pas la PKA (Ohnishi et al., 1992; Teutsch et al., 1992). Le rôle des dimères $\beta\gamma$ provenant de la protéine Gq et Gi est encore incertain dans les mécanismes de signalisation activés par l'Ang II. Cependant, des études récentes démontrent que ces dimères peuvent activer une multitude d'effecteurs incluant la PLA₂, les types I, II et IV de l'adénylyl cyclase, trois des quatre isoformes de la PLC β (1 à 3), les canaux potassiques, les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRKs), la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3-kinase), ainsi que les membres ERKs de la famille des MAP kinases par une interaction directe avec la kinase Raf-1 ou une activation indirecte de p21^{ras}. Ces dimères seraient aussi impliqués dans l'activation de Ste20 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une sérine/thréonine kinase en amont des MAP kinase kinases dans la voie de la réponse aux phéromones dont l'homologue chez les mammifères (PAK) est impliqué dans l'activation de la voie JNK (Clapham et Neer, 1993; Crespo et al., 1994; Stephens et al., 1994; Pumiglia et al., 1995; Leeuw et al., 1998). Ces données suggèrent donc qu'il ne faut pas sous-évaluer le rôle de ces dimères dans la signalisation précoce ainsi que leur participation subséquente dans l'activation des voies intermédiaires et tardives.

3.2.2 Les canaux ioniques

Comme pour les autres hormones mobilisant le Ca²⁺ intracellulaire, certains travaux suggèrent que l'Ang II stimule aussi l'influx de Ca²⁺ à travers des canaux calciques de type L, sensibles au potentiel (Smith, 1986; Ohnishi et al., 1992). L'utilisation d'antagonistes spécifiques de ces derniers, comme la nifédipine, abolit la phase soutenue d'élévation du Ca²⁺ intracellulaire suggérant ainsi un rôle important de ces canaux dans la réponse calcique. D'autres études démontrent également que le récepteur AT₁ induit directement l'ouverture de canaux calciques (Catt et al., 1993). Ces derniers résultats sont cependant controversés.

Malgré ces données relatives à l'existence d'une signalisation précoce importante dans les CMLV, le rôle précis de ces seconds messagers dans l'effet hypertrophique de l'Ang II reste à préciser et plusieurs questions sont encore sans

réponses. Quels sont les rôles des voies α_i et α_q et des dimères $\beta\gamma$? Est-ce que l'activation de la PLC et l'inhibition de l'adénylyl cyclase sont essentielles aux effets trophiques de l'hormone ? Est-ce que l'Ang II active d'autres voies précoces non caractérisées pour l'instant mais essentielles à son action hypertrophique ? Qu'en est-il du récepteur AT₁ humain ? Ce dernier a-t-il la capacité d'induire l'hypertrophie cellulaire comme son homologue chez les rongeurs ? Par la création d'une lignée cellulaire exprimant de façon stable le récepteur AT₁ humain, nous avons répondu en partie à ces questions. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article dont je suis coauteur. Les raisons de l'utilisation d'une telle lignée seront expliquées dans la section discussion.

Suivant la production de ces seconds messagers et la stimulation des canaux ioniques, l'Ang II induit l'activation de mécanismes physiologiques rapides tels que la contraction des CMLV, la sécrétion d'aldostérone et la libération de norépinéphrine au niveau pré-synaptique (voir plus haut). L'hypertrophie des CMLV est un phénomène de longue durée et les lignes qui suivent démontrent le rôle essentiel de certaines kinases et phospholipases dans la signalisation intermédiaire conduisant à une action hypertrophique de l'Ang II dans les CMLV.

3.3 Signalisation intermédiaire

3.3.1 La PLA₂ et la PLD

Comme mentionné auparavant, l'Ang II active la PLD et la PLA₂ dans les CMLV (Lang et Vallotton, 1989; Lassègue et al., 1991; Lassègue et al., 1993; Rao et al., 1994b). À ce jour, peu d'informations sont disponibles concernant le couplage de ces phospholipases à des protéines G. Cependant, bien qu'il soit fort possible que des protéines G non caractérisées pour l'instant soient responsables de l'activation de la PLA₂ et la PLD, l'apparition retardée de leur produits, suivant une stimulation des CMLV par l'Ang II, suggèrent que ces phospholipases sont activées par l'action des seconds messagers comme le DAG et le Ca²⁺ (Griendling et Alexander, 1993; Griendling et al., 1997). Leur activation peut effectivement se faire à la suite d'une stimulation de la PLC car il a été démontré qu'une libération de Ca²⁺ intracellulaire provoque, entre autres, la translocation de ces phospholipases du cytoplasme vers la membrane, là où se trouvent leurs substrats (Liscovitch, 1992). Des données suggèrent également que certaines isoformes des PKCs sensibles au DAG stimuleraient l'activité

de ces phospholipases par phosphorylation (Liscovitch, 1992). Finalement, la cPLA₂ (PLA₂ cytoplasmique) est également activée suite à une phosphorylation par les ERKs (Lin et al., 1993; Durstin et al., 1994), qui comme nous le verrons, sont fortement activées par l'Ang II dans les CMLV (Duff et al., 1992; Tsuda et al., 1992; Giasson et Meloche, 1995). La PLA₂ hydrolyse le lien entre l'acyl en position 2 et le glycérol d'un phospholipide membranaire libérant ainsi l'acide arachidonique et une portion lysophosphatidyl (Liscovitch, 1992). Dans les CMLV, l'Ang II stimule la production de prostacyclines (Lang et Vallotton, 1989) indiquant un lien direct entre la formation d'acide arachidonique et la production d'écossanoïdes. La PLD pour sa part, hydrolyse la phosphatidylcholine, permettant la formation de choline et une accumulation importante et prolongée d'acide phosphatidique (Liscovitch, 1992). Ce dernier est métabolisé de nouveau en DAG par une phosphohydrolase, prolongeant ainsi l'accumulation du second messenger. Le rôle exact des PLD et PLA₂ dans l'effet hypertrophique de l'Ang II reste à préciser. Bien que les ERKs puissent activer la PLA₂ par phosphorylation (voir plus haut), des données démontrent également l'inverse. Effectivement, l'activation des MAP kinases dans les CMLV, et plus spécifiquement du groupe des ERKs (voir plus bas) peut se faire d'une façon dépendante de l'acide arachidonique et de ces métabolites (Rao et al., 1994c). Cependant, le lien entre la production de ces seconds messagers par l'Ang II et l'activation des ERKs reste à vérifier.

3.3.2 Les sérine/thréonine kinases

Les seconds messagers produits par l'Ang II constituent les premiers signaux intracellulaires responsables de la régulation de l'activité de plusieurs protéines kinases. Ces réactions de phosphorylation ont un rôle déterminant dans l'intégration des signaux et de leur propagation vers le noyau, ou vers d'autres compartiments intracellulaires, dont la machinerie traductionnelle. Plusieurs sérine/thréonine kinases dont les PKCs, les MAP kinases, les CAM/kinases et la p70^{s6k} sont activées par l'Ang II. Bien que le rôle précis de chacune de ces kinases dans le phénomène trophique associé à l'Ang II soit encore incertain, plusieurs études récentes suggèrent leur implication.

3.3.2.1 Les PKCs

À ce jour, 11 membres de la famille des PKCs ont été identifiés (Hug et Sarra, 1993; Dekker et Parker, 1994; Newton, 1997). Sur la base de leurs propriétés biochimiques et de leur homologie de séquence, elles ont été divisées en trois groupes: les PKCs classiques ou conventionnelles (cPKC- α , - β 1, - β 2, and - γ), lesquelles sont activées par le DAG et le Ca^{2+} (voir Fig. 3); les PKCs nouvelles (nPKC- δ , - ϵ , - η , μ , et - θ) qui sont indépendantes du Ca^{2+} mais activées par le DAG; et un troisième regroupant des PKCs atypiques (aPKC- ζ , et - λ i) insensibles au DAG et au Ca^{2+} et qui, contrairement aux groupes c- et nPKCs, ne répondent pas aux esters de phorbol. On retrouve 6 de ces 11 isoformes dans les CMLV: 3 cPKCs (α , β 1 et β 2), 2 nPKCs (δ et ϵ) et 1 aPKC (ζ) (Dixon et al., 1994). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques pour certaines isoformes des PKCs, le GF109203X (Toullec et al., 1991), le Gö6976 (Martiny-Baron et al., 1993) et le CGP41251 a permis de démontrer l'implication de ces sérine/thréonine kinases dans l'activation de certaines voies de signalisation stimulées par l'Ang II dans les CMLV. Ainsi, nous avons démontré, par l'utilisation du CGP41251 et du Gö6976, une implication générale des PKCs dans les mécanismes conduisant à une phosphorylation sur résidus tyrosine de la paxilline et sur des résidus sérine et thréonine de 4E-BP1 par l'Ang II, deux effecteurs probablement impliqués dans l'action hypertrophique de l'hormone dans les CMLV (Leduc et al., 1995a; Fleurent et al., 1997). Dans un même ordre d'idée, la phosphorylation de eIF4E par l'Ang II, de même que l'action hypertrophique de l'hormone, sont inhibées par la staurosporine, un inhibiteur cependant peut sélectif (Rao et al., 1994a). La régulation négative des PKCs sensibles aux esters de phorbol (c- et n-PKCs), suite à un traitement de 24 heures au phorbol 12-myristate 13 acétate (PMA), inhibe l'induction des ARNm de *c-fos* ainsi que MKP-1 (Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1) et inhibe la phosphorylation sur résidus tyrosine de PYK2 suivant une stimulation des CMLV par l'Ang II (voir plus bas pour les rôles respectifs de ces trois effecteurs) (Taubman et al., 1989; Duff et al., 1993; Brinson et al., 1998). Finalement, deux groupes ont démontré récemment une implication essentielle des PKCs dans l'activation des effecteurs de la voie ERK (le module Raf-MEK-ERK) par l'Ang II dans les CMLV (Eguchi et al., 1996; Liao et al., 1996). Ainsi, la translocation de Raf et son activation par l'Ang II sont inhibées suite à une régulation négative des c- et nPKCs par le PMA (Liao et al., 1996). Cependant, ce traitement ou l'utilisation du GF109203X n'affecte aucunement l'activation des ERKs par l'Ang II (Eguchi et al., 1996; Liao et al., 1996). Il semble effectivement que l'Ang II emprunte une voie

indépendante de Raf afin d'activer les ERKs dans les CMLV et que la participation des PKCs atypiques (aPKCs, insensibles aux esters de phorbols) puisse être impliquée. En accord avec ces résultats, l'équipe de Parker démontre que les trois groupes des PKCs ont la capacité d'activer les ERKs ainsi que leurs activateurs immédiats, les MEKs (Schönwasser et al., 1998). C'est au niveau de Raf que les cascades signalétiques divergent. Ainsi, alors que les c- et n-PKCs stimulent l'activation de Raf par simple phosphorylation (voir aussi la référence de Kolch et al., 1993), la PKC- ζ , une PKC atypique, ne peut faire de même, suggérant que cette dernière agit directement sur MEK ou via un activateur situé en amont de MEK mais différent de Raf (Schönwasser et al., 1998). Donc la PKC- ζ pourrait être un bon candidat pour expliquer la stimulation des ERKs par l'Ang II indépendamment de l'activation de Raf. Dernièrement, l'équipe de Berk démontrait des résultats allant dans ce sens. En effet, l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre PKC- ζ inhibe complètement l'activation des ERKs par l'Ang II dans les CMLV (Liao et al., 1997). Nous devons cependant être prudents quant à l'importance de ces résultats car il est de plus en plus évident que l'utilisation d'oligonucléotides antisens produit beaucoup d'effets non-spécifiques. De plus des résultats de notre laboratoire démontrent que l'Ang II stimule l'activation de Raf-1 dans les CMLV suggérant ainsi un rôle de cette kinase dans l'activation des ERKs (Giasson et Meloche, résultats non-publiés).

3.3.2.2 Les CAM/kinases

La mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), suivant la stimulation par des agonistes qui induisent l'hydrolyse des phospholipides membranaires, est également une source majeure d'activation de certaines voies de signalisation. Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'activité des phospholipases de même que de certaines PKCs est influencée par une élévation de ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) et plusieurs résultats montrent un rôle essentiel de ce dernier dans la signalisation cellulaire. Ainsi, l'élévation de ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) induite par l'Ang II est, en autres, impliquée dans l'induction du messageur *c-fos* et de *MKP-1* (Taubman et al., 1989; Duff et al., 1993; Scimeca et al., 1997), la phosphorylation sur tyrosine de paxilline (Leduc et Meloche, 1995b) et de PYK2 (Brinson et al., 1998), la phosphorylation en sérine et thréonine de 4E-BP1 (Fleurent et al., 1997) et l'activation des ERKs (Eguchi et al., 1996) (voir Fig. 3). Le Ca^{2+} requiert parfois la participation d'une protéine liant le Ca^{2+} , la calmoduline (CAM), afin d'activer certains effecteurs. C'est le cas pour les kinases dépendantes du Ca^{2+} et de la CAM, la famille des CAM/kinases. La CAM/kinase II se retrouve en

grande quantité dans le cerveau mais on en retrouve également des quantités appréciables dans les tissus périphériques, dont les CMLV. Il a ainsi été démontré que l'Ang II induit une activation importante de la CAM/kinase II dans les CMLV (Abraham et al., 1996), et que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette dernière, le KN-93, inhibe 60% de la réponse à l'Ang II sur l'activation des ERKs, d'où l'implication du Ca^{2+} et de cette kinase dans les voies de signalisation menant à l'activation des ERKs dans les CMLV (Abraham et al., 1997). En accord avec ces résultats, l'équipe du Dr. Inagami a démontré dans le même modèle que le calmidazolium, un inhibiteur de la CAM, inhibait complètement la liaison du GTP à $p21^{ras}$ de même que la stimulation des ERKs par l'Ang II (Eguchi et al., 1996). La famille des CAM/kinases est aussi impliquée dans la phosphorylation de facteurs de transcription. En effet, ces kinases phosphorylent et activent différents membres de la famille CREB (CRE-binding protein)/ATF (Activating Transcription Factor) tels que CREB, CREM τ et ATF-1 (Dash et al., 1991; Sheng et al., 1991; de Groot et al., 1993; Sun et al., 1994b; Shimomura et al., 1996) (voir figure 4, page 41). Bien qu'il n'existe pour l'instant aucune preuve d'une implication de ces facteurs de transcription dans l'effet trophique de l'Ang II, ces données suggèrent néanmoins un rôle de la famille de ces kinases dans la régulation de la machinerie transcriptionnelle.

3.3.2.3 Les MAP kinases ERK

Les ubiquistes "extracellular-signal -regulated kinases" ou ERKs sont des sérine/thréonine kinases représentées par deux isoformes, $p44^{mapk}$ et $p42^{mapk}$ ou ERK1 et ERK2 respectivement. Leur activation est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dont la prolifération et la différenciation cellulaires sont les mieux documentées (voir Robinson et Cobb, 1997 pour revue). Ces kinases font partie de la famille des MAP kinases, laquelle est divisée en trois sous-familles sur la base de leurs similarités de séquence et de leurs différents mécanismes d'activation: les ERKs, les JNKs et p38 (voir tableau II, page 38). L'activité enzymatique des JNKs et p38 est stimulée généralement suivant un stress environnemental (chocs thermique et osmotique, exposition aux U.V) ou une exposition aux cytokines proinflammatoires. Comme pour ce qui est des ERKs, ces kinases sont activées par une cascade de kinases bien caractéristique à chacune (voir tableau II). D'autres membres se sont ajoutés à la famille des MAP kinases comme ERK3, ERK5 et ERK6, mais leur rôles respectifs restent encore à préciser et peu d'informations existent sur les mécanismes impliqués dans leur activation (Robinson et Cobb, 1997).

La voie des ERKs est la mieux caractérisée de ces cascades. Ainsi, les facteurs de croissance classiques comme le PDGF et l'EGF stimulent cette cascade par liaison et activation des récepteurs tyrosine kinases membranaires, lesquels, après transphosphorylation sur des résidus tyrosine spécifiques, recrutent un complexe de protéines adaptatrices contenant des domaines de liaison SH2 ou PTB (Shc, Grb2-SOS) (voir plus bas pour explication, section sur les tyrosine kinases) (Denhardt, 1996). Cette association entre les récepteurs et ce complexe permet de positionner SOS, un facteur d'échange guanilyque, dans l'environnement de p21^{ras} qui sera activé par l'échange du GDP par le GTP. p21^{ras} activé participe ensuite à la translocation de Raf-1 dans l'environnement membranaire et cause ainsi son activation par des mécanismes encore peu documentés mais faisant intervenir des processus de phosphorylation. Raf-1 fait partie de la famille des MAP kinase kinase kinases (voir tableau II) qui est représentée également par A-Raf, B-Raf, et les MEK kinases (Robinson et Cobb, 1997). Il a été démontré que Raf-1 est responsable de l'activation, par phosphorylation sur deux résidus sérine (Ser²¹⁸ et Ser²²²), des kinases à double spécificité MEK1/2, lesquelles activent ensuite les deux isoformes ERK1 et 2 en les phosphorylant sur les résidus thréonine et tyrosine dans le motif conservé TEY (Thr¹⁸³ et Tyr¹⁸⁵) (Malarkey et al., 1995). Cette cascade d'activation Raf-MEK-ERK est un mécanisme très conservé. Passant de la levure aux mammifères, on retrouve également des mécanismes semblables dans l'activation des voies JNKs et p38 mais avec la participation de partenaires différents (voir tableau II). Il y a déjà quelques années, des équipes de recherche, dont la nôtre, ont démontré que l'Ang II stimulait fortement l'activation des ERKs dans les CMLV en culture (Duff et al., 1992; Tsuda et al., 1992; Giasson et Meloche, 1995). Cette activation des ERKs est maximale après 5 minutes de stimulation et transitoire car on note un retour au niveau basal d'activité après 30 minutes de stimulation (Fleurent et al., 1997). De plus, *in vivo*, l'administration d'Ang II provoque l'activation des ERKs de même que de JNK dans les artères de rat (Xu et al., 1996). *In vitro*, l'activation de la voie JNK par l'Ang II a été démontrée dans les hépatocytes de rat (Zohn et al., 1995) et nous avons des données démontrant également que cette hormone stimule l'activation de p38 dans les CMLV (Giasson et Meloche, résultats soumis pour publication) démontrant ainsi que ces voies normalement activées par des stress cellulaires peuvent dans certains cas être activées par des facteurs de croissance comme l'Ang II.

Pour en revenir aux ERKs, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de ces kinases par l'Ang II restent encore à préciser car beaucoup de

résultats se contredisent et plusieurs voies de signalisation semblent impliquées. Nous ne ferons ici qu'un bref résumé des voies probablement concernées. Ainsi, comme pour ce qui est du PDGF, l'Ang II induit également la phosphorylation sur résidus tyrosine de protéines adaptatrices comme Shc et la formation de complexes entre Shc et Grb2/SOS (Linseman et al., 1995). Cette hormone provoque donc l'activation de p21^{ras} (sa liaison au GTP) (Okuda et al., 1996; Schieffer et al., 1996; Takahashi et al., 1997a), la formation de complexe entre p21^{ras} et Raf-1 (Liao et al., 1996; Schieffer et al., 1996) et la phosphorylation de même que l'activation de Raf-1 (Ishida et al., 1992; Molloy et al., 1993; Liao et al., 1996; Giasson et Meloche, résultats non-publiés) (voir Fig. 3). Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des PKCs, des tyrosine kinases, de la CAM/kinase II ou de chélateur de Ca²⁺, certains groupes affirment ou infirment leur implication individuelle ou combinée (voir exemples plus haut). Même l'implication de p21^{ras} reste discutable car l'expression d'une forme dominante négative de cette dernière dans les CMLV (par l'utilisation d'adénovirus) inhibe l'activation de p21^{ras} endogène sans cependant affecter l'activation des ERKs par l'Ang II (Takahashi et al., 1997a). Or pour l'instant, les partenaires impliqués dans l'activation du module Raf-MEKs-ERKs sont plus ou moins bien caractérisés d'où l'impossibilité de faire un schéma précis sur les voies de signalisation activées par l'Ang II et impliquées dans l'activation de ces kinases. Cependant, des résultats de notre laboratoire indiquent que l'Ang II stimule la phosphorylation sur tyrosine du récepteur à l'EGF, évènement essentiel dans l'activation du module Raf-1/MEKs/ERKs par l'Ang II dans les CMLV (Foisly et Meloche, résultats non-publiés; voir section 3.3.3.4 et Fig.3).

Les ERKs sont des kinases dirigées contre des résidus sérine et/ou thréonine suivis d'un résidu proline ("proline-directed serine/threonine kinases"). Il a été démontré effectivement que les motifs Pro-Leu-Ser/Thr-Pro ou Ser/Thr-Pro sont fortement reconnus par les ERKs, suggérant ainsi que certaines protéines sont des substrats physiologiques potentiels de ces kinases (Seeger et Krebs, 1995). Plusieurs de ces protéines sont nucléaires et la phosphorylation des ERKs est généralement suivie d'une translocation de ces dernières dans le noyau où elles phosphorylent plusieurs facteurs de transcription tels que Elk-1, SAP-1 (une protéine accessoire de SRF), c-Fos, et c-Myc (voir tableau II) (Edwards, 1994; Karin, 1995; Denhardt, 1996). Ainsi, la phosphorylation par les ERKs de Elk-1 augmente son activité transcriptionnelle et induit la transcription du gène *c-fos* (voir section sur la signalisation tardive) par sa liaison à un autre facteur de transcription, SRF (serum response factor) situé sur l'élément de réponse SRE (serum response element) dans le promoteur du gène (voir

Fig. 4). L'activité transcriptionnelle de c-Fos et c-Jun est ensuite modulée par phosphorylation par la famille des MAP kinases (Karin, 1995) (voir tableau II). c-Fos et c-Jun forment un complexe transcriptionnel AP-1 liant l'élément *cis* TRE retrouvé dans certains promoteurs dont celui de *c-fos* (voir Fig. 4) et de l' α -actine (voir plus bas, section sur la signalisation tardive). Les STATs sont aussi des substrats potentiels des ERKs (voir Fig. 3). Ces facteurs de transcription sont activés normalement par les cytokines et la voie des JAKs (voir plus bas, section sur les tyrosine kinases). Il a été cependant démontré par exemple que le résidu sérine 727 de STAT1 est effectivement un site pour les ERKs et que la phosphorylation de ce site influence l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Wen et al., 1995). Les ERKs ont également des substrats cytoplasmiques incluant entre autres des effecteurs impliqués dans leur activation comme SOS (Denhardt, 1996), des phospholipases comme la cPLA₂ et une kinase, appelée aussi MAPKAPK1 pour "mitogen-activated protein kinase activated protein kinase" ou p90^{rsk} (Durstin et al., 1994), (voir Fig. 3 et tableau II). L'Ang II stimule ainsi l'activation de p90^{rsk} dans les CMLV (Takahashi et al., 1997b) et, comme pour ce qui est des ERKs, cette activation est suivie de son accumulation dans le noyau et de la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription incluant SRF (Rivera et al., 1993) et c-Fos (Seger et Krebs, 1995). Ces exemples démontrent donc un rôle très important des ERKs dans la régulation de l'activité de la machinerie transcriptionnelle et de ce fait, probablement de leur implication dans l'effet hypertrophique global de l'Ang II dans les CMLV. Finalement, des données obtenues *in vitro* démontrent que MNK1 (voir Fig. 3) ainsi que GSK-3 ou "glycogene synthase kinase-3" sont toutes deux des kinases phosphorylées par les ERKs et p90^{rsk} respectivement (Seger et Krebs, 1995; Fukunaga et Hunter, 1997; Waskiewicz et al., 1997). Ces deux kinases sont impliquées dans la régulation de la machinerie traductionnelle et indiquent ainsi un lien entre l'activation des ERKs et le contrôle de la traduction de certains ARNm en protéines. Le rôle de ces deux kinases sera discuté dans la section discussion.

Du fait que l'Ang II stimule fortement l'activité des ERKs dans les CMLV, et que ces kinases sont impliquées dans différents processus de croissance cellulaire, il devenait donc essentiel de caractériser leur implication dans les phénomènes hypertrophiques de l'hormone. Grâce au développement d'un inhibiteur spécifique de l'activation de MEK, le PD98059 (Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995; Pang et al., 1995), nous avons pu disposer d'un outil pharmacologique afin de répondre à cette

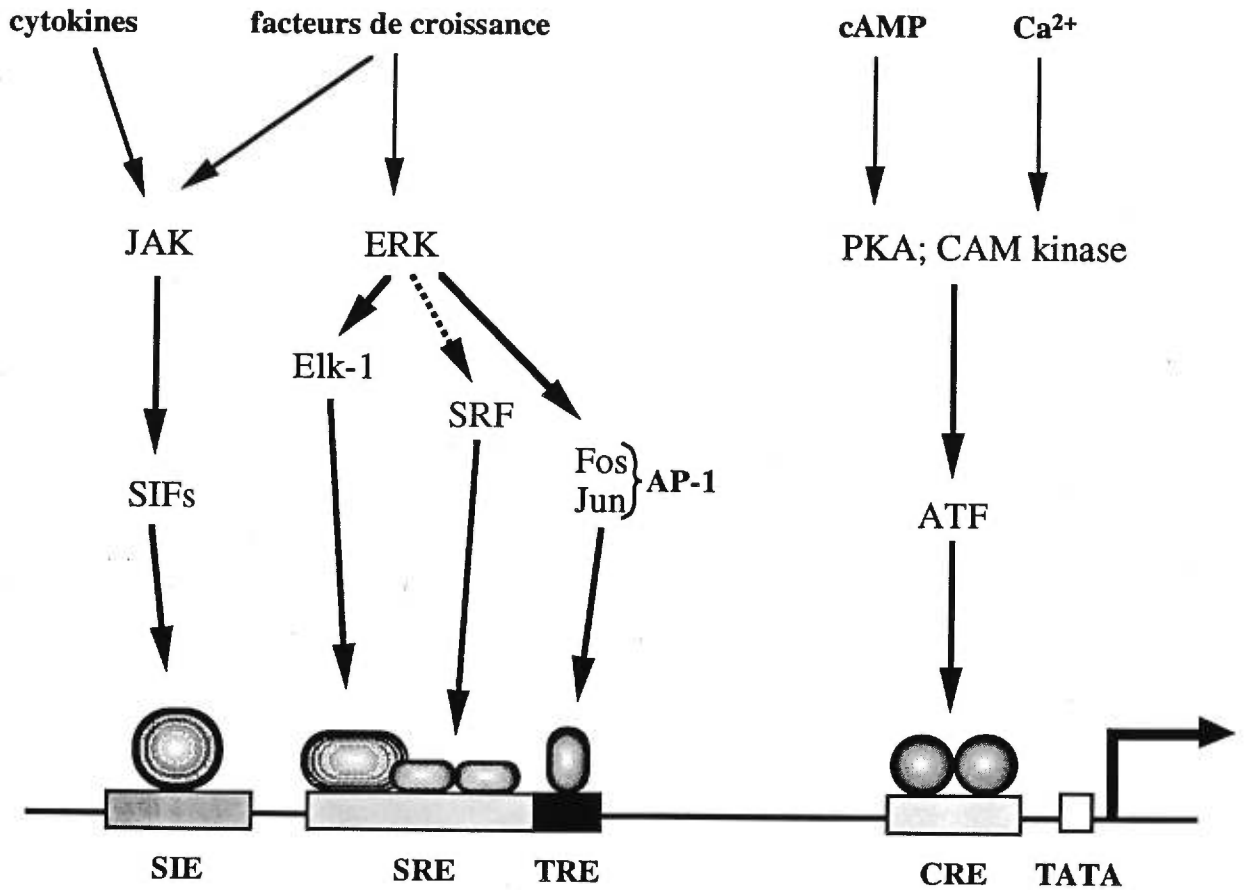


Figure 4: Organisation des sites de liaison des facteurs de transcription dans le promoteur du gène *c-fos*. Les éléments de réponse sont: CRE (cAMP response element); AP-1 (activator protein 1); SRE (serum response element) et SIE (sis-inducing element). Les facteurs de transcription sont: ATF (activating transcription factor); SRF (serum response factor); SIF (sis-inducible factor).

question. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article dont je suis le premier auteur.

3.3.3 Les tyrosines kinases

La phosphorylation sur résidus tyrosine représente moins de 0.1% de la totalité des résidus phosphorylés dans une cellule (Pimental, 1994). Néanmoins, elle est essentielle pour la transduction des signaux relayés par les récepteurs tyrosine kinases, mais également pour les récepteurs couplés aux protéines G. En effet, plusieurs données suggèrent que la phosphorylation sur tyrosine joue un rôle important dans les phénomènes de croissance associés à l'activation de ces récepteurs. Quelques études ont ainsi démontré que des facteurs de croissance comme la bombésine, la vasopressine, l'endothéline, la bradykinine et l'acide lysophosphatidique stimulent la phosphorylation sur tyrosine d'une multitude de substrats dans des cellules cibles (Force et al., 1991; Leeb-Lundberg et Song, 1991; Zachary et al., 1991; Hordijk et al., 1994). L'Ang II induit aussi la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines dans les CMLV dont IRS-1, FAK, paxilline, Shc, PLC- γ 1, JAK2, TYK2, STAT 1, STAT 2, STAT 3, PYK2, PTP-1D et c-Src (Molloy et al., 1993; Marrero et al., 1994; Polte et al., 1994; Ishida et al., 1995; Linseman et al., 1995; Okuda et al., 1995; Leduc et al., 1995a; Marrero et al., 1995a; Leduc et Meloche, 1995b; Ali et al., 1997a; Brinson et al., 1998) (voir Fig. 3). Le rôle de ces substrats, protéines adaptatrices, kinases ou phosphatases dans l'effet hypertrophique de l'Ang II reste à préciser. D'une façon générale cependant, nous avons démontré que la phosphorylation sur résidus tyrosine est essentielle à l'effet trophique de l'hormone, puisque l'utilisation de deux inhibiteurs spécifiques des tyrosine kinases, la génistéine et l'herbimycine A, inhibe complètement la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV (Leduc et al., 1995a), (voir Fig. 3).

3.3.3.1 La famille Src

Les tyrosine kinases Src représentent une famille très importante des tyrosine kinases cytoplasmiques. Trois des neuf membres de cette famille, c-Src, Fyn et Yes sont exprimés de façon ubiquiste, c-Src étant la mieux caractérisée (Erpel et Courtneidge, 1995; Parsons et Parsons, 1997). Ces kinases peuvent s'associer à la membrane plasmique grâce à un ou plusieurs sites d'acylations dans la partie amino-terminale. De plus, elles contiennent toutes des domaines d'environ 100 acides aminés

impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ainsi, ces kinases et plusieurs autres protéines contiennent des domaines SH2 et SH3 pour "Src homology 2 or 3 domains". Les domaines SH2 sont impliqués dans la liaison d'un motif particulier comportant un résidu tyrosine phosphorylé alors que le domaine SH3 lie des motifs riches en résidus proline. Des phospholipases comme PLC γ , des GTPases comme GAP, des protéines adaptatrices comme Grb2 et Nck, une kinase des phospholipides membranaire comme la PI3-kinase (sa sous-unité régulatrice p85) et des facteurs de transcription comme les STATs (signal transducers and activators of transcription) contiennent tous des domaines SH2 et SH3. Cependant, des protéines adaptatrices comme Shc et IRS-1 contiennent, en plus des domaines SH2, un autre type de domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine dépendantes d'une phosphorylation sur tyrosine. Ce domaine d'environ 200 acides aminés est appelé PTB pour "phosphotyrosine binding domain" (Pawson, 1995). Donc, la présence de domaines SH2 et PTB dans plusieurs protéines impliquées dans la signalisation cellulaire démontre à quel point la phosphorylation sur tyrosine est importante. Pour en revenir à c-Src, cette kinase phosphoryle plusieurs substrats parmi lesquels GAP (une GTPase de p21^{ras}), FAK et plusieurs composantes du cytosquelette dont la cortactine (Erpel et Courtneidge, 1995; Parsons et Parsons, 1997). De plus, comme pour ce qui est de JAK, FAK et PYK2 (voir plus bas), c-Src peut s'autophosphoryler.

Bien que plusieurs membres de la famille Src soient exprimés dans les CMLV (c-Src, Fyn, Yes et Lyn) (Ishida et al., 1998), plusieurs travaux suggèrent un rôle important de c-Src dans la signalisation dépendante de l'Ang II dans les CMLV. Ainsi, la stimulation de ces cellules par l'Ang II induit une activation rapide de c-Src (Ishida et al., 1995) (Giasson et Meloche, résultats non-publiés). Par une approche originale consistant à électroporer des anticorps spécifiques contre c-Src dans les CMLV, l'équipe de Berstein suggère une implication de c-Src dans la phosphorylation de la PLC γ (Marrero et al., 1995b) et dans l'activation de p21^{ras} (Schieffer et al., 1996). Bien que ces résultats ne sont pas pour l'instant reproduits par d'autres groupes, différentes approches pharmacologiques et moléculaires, dont l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la famille Src, l'expression d'une forme dominante négative ou l'utilisation d'une lignée de CMLV de souris transgéniques nulles au locus du gène Src, démontrent une implication importante de cette tyrosine kinase dans l'activation des ERKs par l'Ang II (Ishida et al., 1998). Contrairement aux JAKs (voir le prochain paragraphe), c-Src ne semble pas s'associer directement au récepteur AT₁ dans les CMLV (Ishida et al., 1995). Finalement, le rôle de la famille c-Src dans les effets

trophiques de l'Ang II reste à préciser mais l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique PP-1 (ou CP-188,556) inhibe de façon dose-dépendante la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV (Foisy et Meloche, résultats non-publiés, voir Fig. 3).

3.3.3.2 FAK et PYK2

FAK ou "focal adhesion kinase" est, comme son nom l'indique, une tyrosine kinase faisant partie des complexes d'adhésion focaux. Ces complexes, composés de plusieurs protéines comme la paxilline et la tensine, sont des sites spécialisés d'adhésion cellulaire. Par le fait même que l'Ang II induise l'hypertrophie des CMLV, ceci implique des modifications au niveau du cytosquelette mais également au niveau des points d'ancrage de la cellule au substrat. Des équipes ont ainsi démontré que cette hormone induit une phosphorylation rapide sur tyrosine de FAK (Polte et al., 1994; Okuda et al., 1995). Bien que cette kinase possède des sites préférentiellement phosphorylés par c-Src, et que la phosphorylation de ces sites augmente l'activité enzymatique de la kinase (Calalb et al., 1995), FAK a également la capacité de s'autophosphoryler sur le résidu Tyr³⁹⁷ par un mécanisme peu caractérisé. Ce résidu semble avoir un rôle important puisque plusieurs études récentes suggèrent que la formation d'un complexe entre FAK et c-Src augmente l'activité de cette dernière par un mécanisme mettant en jeu le domaine SH2 de c-Src et le résidu phosphorylé Tyr³⁹⁷ de FAK (Parsons et Parsons, 1997).

Un des substrats potentiel de FAK est la paxilline et nous avons démontré, de concert avec une autre équipe, que cette protéine est fortement phosphorylée sur tyrosine par l'Ang II (Turner et al., 1995; Leduc et Meloche, 1995b), faisant ainsi de FAK un bon candidat pour expliquer la phosphorylation sur tyrosine de la paxilline. Cette hypothèse est cependant indirecte car nous n'avons pas pour l'instant de composés pouvant inhiber de façon spécifique l'activité enzymatique de FAK dans notre modèle. Cependant, des données intéressantes de notre groupe démontrent que l'élévation de l'AMPc dans les CMLV inhibent spécifiquement la phosphorylation sur tyrosine de la paxilline lorsque les cellules sont stimulées par l'Ang II (voir section résultats). Cette élévation d'AMPc n'affecte toutefois pas la phosphorylation sur tyrosine de FAK et donc possiblement sa stimulation par l'Ang II. Si effectivement, une élévation de l'AMPc n'affecte pas l'activation de FAK par l'Ang II dans les CMLV (ceci reste à vérifier), ces résultats suggéreront, de façon indirecte cependant, que FAK n'est probablement pas la kinase qui phosphoryle la paxilline *in vivo* lorsque les CMLV

sont stimulées par l'Ang II. Malgré ces résultats intéressants, il reste encore à préciser le rôle de la phosphorylation sur tyrosine de FAK et de la paxilline dans les effets trophiques de l'hormone.

Récemment, une tyrosine kinase ayant un fort degré d'homologie avec FAK a été identifiée (Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995). Cette kinase appelée PYK2 est exprimée dans plusieurs types cellulaires, dont les CMLV (Giasson et al., voir section résultat; Brinson et al., 1998). La phosphorylation ou l'autophosphorylation sur tyrosine de PYK2, sur le résidu 402 (analogue au résidu 397 de FAK), permet la liaison de protéines avec des domaines SH2 comme Lck et Fyn de la famille Src (Li et al., 1996). Il est donc possible, comme pour ce qui est de FAK, que cette kinase soit impliquée dans la signalisation cellulaire dépendante de la famille Src. Plusieurs agonistes couplés aux protéines G ont la capacité d'induire l'autophosphorylation sur tyrosine de PYK2 et ainsi de l'activer (Lev et al., 1995; Dikic et al., 1996; Li et Earp, 1997). Il a ainsi été démontré que l'activité de cette tyrosine kinase est modulée de façon positive par le Ca^{2+} et les PKCs (Lev et al., 1995; Yu et al., 1996). Les substrats potentiels de PYK2 sont des protéines adaptatrices comme p130^{Cas} et la paxilline (Li et Earp, 1997), dont la phosphorylation sur tyrosine est dépendante du Ca^{2+} dans les CMLV (Leduc et Meloche, 1995b). Bien que le rôle de cette kinase soit incertain, deux équipes dont la nôtre ont démontré que l'Ang II stimule la phosphorylation sur tyrosine de PYK2 (Giasson et al., voir section résultats; Brinson et al., 1998) et voir Fig. 3. Ces résultats intéressants sont cependant préliminaires et plusieurs études seront nécessaires afin de caractériser le rôle de cette kinase dans les effets hypertrophiques de l'Ang II, et ainsi de la situer dans les multiples voies de signalisation qu'active ce peptide dans les CMLV.

3.3.3.3 La famille des JAKs

Contrairement aux récepteurs à activité tyrosine kinase, comme les récepteurs du PDGF, de l'EGF ou du bFGF, les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs aux cytokines n'ont aucune activité tyrosine kinase intrinsèque. Néanmoins, ces derniers lient des facteurs de croissance et permettent, grâce entre autres à l'activation de tyrosine kinases cytoplasmiques comme la famille Src, de transmettre des signaux de la membrane vers le noyau. Ainsi, les récepteurs des cytokines (récepteurs de l'interleukine 2, de l'interféron (INF)- γ et INF- α) activent la voie des ERKs et l'expression de l'ARNm de *c-fos* de façon dépendante d'une activité tyrosine

kinase. Ces tyrosine kinases sont de la famille Src (Lck et Fyn) (Pleiman et al., 1993) et de la famille des JAKs pour "Janus Kinases" (Darnell et al., 1994). Ces dernières forment une famille de quatre membres, JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Suite à la liaison des cytokines aux récepteurs et à leur dimérisation, ces kinases se lient à des motifs conservés sur ces derniers appelés "box 1 et 2" (Darnell et al., 1994). À la suite de cette liaison, les JAKs s'autophosphorylent et phosphorylent également les récepteurs sur des résidus tyrosine, créant ainsi des sites de liaison de haute affinité pour des facteurs de transcription de la famille des STATs (qui contiennent des domaines SH2, voir plus haut). Ces STATs sont à leur tour phosphorylés sur tyrosine par les JAKs et forment par la suite des homo ou hétérodimères appelés SIF pour "Sis inducing factor" qui passeront dans le noyau et induiront la transcription de certains gènes ayant dans leur promoteur une séquence appelée SIE pour "Sis inducing element". On retrouve cette séquence, entre autres, dans le promoteur du gène *c-fos* (voir Fig. 4) (Ihle et al., 1994). Cette voie bien particulière qu'empruntent les récepteurs aux cytokines est donc la voie la plus rapide entre un récepteur membranaire activé et la machinerie transcriptionnelle d'une cellule. Le fait que le récepteur AT₁ n'a pas de domaine catalytique a poussé l'équipe de Bernstein à vérifier si l'Ang II, suite à sa liaison au récepteur AT₁, n'activait pas également les JAKs, comme pour ce qui est des récepteurs aux cytokines. C'est ainsi que cette équipe a démontré que l'Ang II induit effectivement la phosphorylation sur tyrosine ainsi que l'activation de JAK2 et TYK2 dans les CMLV (Marrero et al., 1995a), (voir Fig. 3). Ce phénomène n'est pas exclusif à l'Ang II puisque la thrombine, une autre hormone liant des récepteurs couplés aux protéines G, induit également la phosphorylation en tyrosine de JAK2 dans les plaquettes (Rodriguez-Linares et Watson, 1994). Cette activation des JAKs dans les CMLV est suivie d'une phosphorylation sur tyrosine (15 minutes) des STAT1/β et STAT2, résultats en accord avec l'équipe de Baker qui démontre que l'Ang II, suite à sa liaison au récepteur AT₁, active également STAT91 ou STAT1 dans les fibroblastes cardiaques (Bhat et al., 1994; voir Fig. 3). Comme pour ce qui est des récepteurs aux cytokines, des données démontrent une association physique directe entre le récepteur AT₁ et JAK2 dans les CMLV (Marrero et al., 1995a; Ali et al., 1997b). Le motif impliqué semble être situé dans la queue carboxy-terminale du récepteur, mais il n'a aucune homologie de séquence avec le motif "box 1" (Ali et al., 1997b). Finalement, l'utilisation d'un inhibiteur de JAK2, le AG490, inhibe la phosphorylation sur tyrosine des ERKs par l'Ang II dans les CMLV. Ces auteurs soumettent ainsi l'hypothèse que JAK2 serait une Raf kinase (Marrero et al., 1997). Bien que nous n'ayons pas reproduit de tels résultats sur l'activation des ERKs par

l'Ang II, nous devons cependant tenir compte des effets transcriptionnels de ces kinases et ainsi de leur possible implication dans l'effet hypertrophique de l'hormone. En effet, des résultats préliminaires indiquent que le AG490 inhibe de façon dose-dépendante la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV (Servant et Meloche, résultats non-publiés, voir section discussion).

3.3.3.4 Les interactions avec les récepteurs à activité tyrosine kinase: cas des récepteurs au PDGF et à l'EGF

Du fait que des agonistes des récepteurs couplés aux protéines G comme l'Ang II induisent l'activation de tyrosine kinases cytoplasmiques (cSrc, JAKs, FAK, PYK2, etc...), il est donc concevable que ces kinases puissent avoir comme substrats des récepteurs tyrosine kinases. Ces récepteurs phosphorylés sur tyrosine serviraient de sites d'ancrage à la membrane plasmique pour des protéines adaptatrices ou des enzymes ayant des domaines SH2 et/ou PTB. Ce phénomène d'interaction entre les récepteurs à sept passages transmembranaires et des tyrosine kinases a été observé pour la première fois dans les CMLV par l'équipe de Jones en 1995. Ils ont démontré que l'Ang II induisait la phosphorylation sur tyrosine de Shc, la formation de complexes entre Shc et Grb2, et une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine du récepteur β du PDGF qui co-précipitait avec des complexes Shc-Grb2 et c-Src (Linseman et al., 1995). Ces résultats indiquaient donc une possibilité de "cross-talk" entre le récepteur AT₁ et un récepteur à activité tyrosine kinase. Une étude récente confirme la possibilité d'un tel phénomène puisque l'ET-1, l'acide lysophosphatidique et la thrombine induisent tous la phosphorylation sur tyrosine du récepteur à l'EGF dans les fibroblastes Rat1 (Daub et al., 1996). L'inhibition spécifique de la fonction du récepteur à l'EGF par l'utilisation du AG1478, ou l'expression d'une forme dominante négative du récepteur, inhibe complètement l'activation des ERKs, l'induction de l'ARNm de *c-fos* et la synthèse d'ADN par l'ET-1 ou la thrombine. La thrombine induit également la phosphorylation sur tyrosine du récepteur IGF-1 (Rao et al., 1995) dans les CMLV. De plus, des résultats récents de notre laboratoire indiquent que l'Ang II stimule la phosphorylation sur tyrosine du récepteur à l'EGF. Cette action semble importante pour les effets trophiques de l'hormone dans les CMLV puisque l'utilisation de l'inhibiteur AG1478 antagonise l'activation des ERKs et la synthèse protéique induite par l'Ang II (Foisly et al., résultats non-publiés, voir Fig. 3).

À l'heure actuelle, on ne peut être certain de la participation de toutes ces tyrosine kinases dans l'effet hypertrophique de l'Ang II. Cependant, c'est par l'utilisation de deux agents pharmacologiques, le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) et la forskoline, qui inhibent spécifiquement la phosphorylation sur tyrosine de protéines par l'Ang II (voir Fig. 3), que nous avons pu commencer à vérifier l'importance de plusieurs tyrosine kinases dans les effets trophiques de l'Ang II. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article dont je suis coauteur, étant ainsi responsable de la caractérisation des propriétés pharmacologiques du récepteur AT₁, de la quantification de l'InsP₃, et des analyses Northern et Western.

3.3.4 La PI3-kinase et la voie de la p70^{s6k}

L'effet global de l'Ang II sur la synthèse protéique est en partie due à l'augmentation de la vitesse de traduction des ARNm (voir plus haut). Grâce au modèle de l'insuline, plusieurs effecteurs sont déjà caractérisés et leur implication dans l'initiation de la traduction ou la traduction d'ARNm spécifiques chez les cellules de mammifère est bien établi. Nous en ferons ici un bref résumé en terminant par les effets de l'Ang II sur certains de ces effecteurs dans les CMLV.

Plusieurs travaux démontrent qu'une famille d'enzymes cytoplasmiques, les PI3-kinases, est responsable de l'activation d'effecteurs impliqués dans l'initiation de la traduction et la traduction d'ARNm spécifiques. Cette famille est divisée en trois classes (1,2 et 3) dont la classe 1 est la mieux caractérisée (Vanhaesebroeck et al., 1997). La PI3-kinase de la classe 1A est formée de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice et/ou adaptatrice de 85kDa contenant deux domaines SH2 et un domaine SH3, et une sous-unité catalytique de 110kDa (voir Fig. 3). Plusieurs protéines adaptatrices phosphorylées sur tyrosine, dont IRS-1 et Gab-1, de même que les récepteurs tyrosine kinases, recrutent à la membrane la PI3-kinase via la sous-unité p85 et ainsi l'activent à proximité de son substrat membranaire. Une autre façon de recruter cette enzyme à la membrane est par l'interaction GTP dépendante entre p21^{ras} et la sous-unité catalytique p110 (Rodriguez-Viciana et al., 1994). La classe 1B, moins bien caractérisée que la précédente, n'est pas modulée par la présence de protéines adaptatrices, comme la classe 1A, mais est stimulée par p21^{ras} et également par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G (Vanhaesebroeck et al., 1997). Or, bien que la classe 1A soit stimulée par les récepteurs couplés aux protéines G, la classe 1B est également un bon candidat. *In vivo*, le substrat de ces PI3-kinases de la classe 1 est le

phospholipide de faible abondance PIP₂, lequel est également un substrat pour les PLCs (voir plus haut et Fig. 3). Cependant, ces PI3-kinases n'hydrolysent pas le phospholipide mais phosphorylent le groupement hydroxyle en position 3 sur l'anneau inositol et forme le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) (Vanhaesebroeck et al., 1997). Après la production du PIP₃, ce dernier sert de site d'ancrage pour des protéines kinases comme AKT ayant un domaine PH (pleckstrin homology), (voir Fig. 3). Ce domaine, ayant une haute affinité pour les formes phosphorylées des phospholipides inositol, permet ainsi à cette kinase de transloquer à la membrane pour être activée par une autre kinase comme PDK1, qui elle semble constitutivement active (Alessi et al., 1997; Proud et Denton, 1997; Stokoe et al., 1997). Cette cascade de sérine/théonine kinases (PDK1-AKT) conduit à la stimulation de la kinase mTOR/RAFT1, laquelle est la cible de l'immunosupresseur rapamycine (voir Fig. 3). À son tour, mTOR/RAFT1 active la p70^{s6k} par des processus qui sembleraient impliquer la protection de cette dernière contre l'activité d'une phosphatase et la phosphorylation d'un site (Thr³⁸⁹), lequel serait essentiel à l'activation de la kinase (Dennis et al., 1996; Pullen et Thomas, 1997; Pullen et al., 1998). Des données suggèrent également que la voie mTOR/RAFT1 serait en amont des voies menant à la phosphorylation des 4E-BPs (voir plus haut et Fig. 3) car la phosphorylation de ces dernières est inhibée par l'utilisation de la rapamycine (Graves et al., 1995; Lin et al., 1995; Beretta et al., 1996; Proud et Denton, 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997; Burnett et al., 1998).

Ces deux effecteurs (p70^{s6k} et 4E-BPs) sont impliqués à leur tour dans le contrôle de la traduction de certaines classes d'ARNm. Ainsi, la p70^{s6k} est impliquée dans la phosphorylation de la protéine ribosomale S6. La phosphorylation de la protéine S6 semble impliquée dans la traduction de certaines classes d'ARNm contenant une séquence riche en polypyrimidines dans la partie non-traduite en 5', comme des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation (Proud et Denton, 1997). D'autres ARNm contenant des structures secondaires dans la partie 5' non-traduite, comme c-myc et l'ornithine décarboxylase, ont besoin du complexe d'initiation eIF4F afin de permettre le bris de ces structures secondaires et ainsi l'initiation de la traduction. Le facteur d'initiation de la traduction eIF4E lie la coiffe en 5' des ARNm et il est responsable de l'assemblage des facteurs menant à la formation du complexe eIF4F. Comme mentionné plus haut, l'activité de eIF4E est modulée par phosphorylation mais aussi par sa liaison aux protéines 4E-BPs. Les protéines 4E-BPs forment un complexe avec eIF4E et inhibent donc la formation des complexes eIF4F et

ainsi le démarrage de la traduction (Proud et Denton, 1997). Alors qu'il est bien établi que la p70^{s6k} exerce des actions importantes au niveau de la machinerie traductionnelle, une étude a également démontré que cette kinase phosphoryle le facteur de transcription CREM τ (cAMP-response element modulator) (de Groot et al., 1994). Cette phosphorylation sur un résidu sérine, qui est un site phosphorylé également par la PKA, induit la transactivation de ce facteur. Ce résultat très intéressant indique que la p70^{s6k} influence également l'activité de la machinerie transcriptionnelle.

Plusieurs données suggèrent que l'Ang II induit une augmentation de la vitesse de synthèse protéique également par l'activation de la p70^{s6k} et la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLV. Comme mentionné plus haut, nous avons démontré que la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ stimule la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLV, entraînant ainsi sa dissociation du facteur eIF4E (Fleurent et al., 1997). Nous avons également démontré, par l'utilisation de la rapamycine, que la voie mTOR/RAFT1 est impliquée de façon importante dans les effets trophiques de l'hormone puisque cet immunosuppresseur abolit totalement la stimulation de la p70^{s6k} par l'Ang II et réduit de 70% la synthèse protéique induite par l'hormone (Giasson et Meloche, 1995). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cardiomyocytes en culture où l'Ang II, comme nous l'avons vu, a des effets hypertrophiques (Sadoshima et Izumo, 1995). L'Ang II active également les effecteurs en amont de mTOR/RAFT1 dans les CMLV. Effectivement, notre équipe et une autre de Winnipeg, démontrent que l'Ang II stimule la PI3-kinase et la PKB (Giasson et Meloche, 1997, résultats soumis pour publication; Saward et Zahradka, 1997). De plus, l'utilisation de deux inhibiteurs de la PI3-kinase, la wortmannin et le LY294002, inhibent complètement l'activation de cette kinase et la synthèse protéique induite par l'Ang II (voir Fig. 3, Giasson et Meloche, 1997; résultats soumis pour publication). Tous ces résultats démontrent un rôle important de la cascade PI3-kinase-mTOR/RAFT1 dans la régulation de la machinerie traductionnelle par l'Ang II.

3.3.5 Les phosphatases

Les paragraphes précédents ont résumé l'implication possible de plusieurs sérine/thréonine et tyrosine kinases dans les voies de signalisation qu'emprunte l'Ang II afin d'augmenter la vitesse de synthèse protéique dans les CMLV. L'activation de ces kinases implique en général des processus de phosphorylation (cascade des MAP kinases, voie de la PI3-kinase, etc...) ou d'autophosphorylation (FAK, PYK2, JAK2

et TYK2). La façon de terminer une activation générale des voies de signalisation que stimule l'Ang II est, comme il a été discuté plus haut, la désensibilisation réceptorielle. Cependant, la façon de terminer de façon spécifique l'activation de ces kinases est tout simplement d'activer des phosphatases qui les déphosphoryleront directement et ainsi les inactiveront. À l'heure actuelle cependant, peu de phosphatases ont été identifiées comme étant régulateurs des effets de l'Ang II dans les CMLV ou tout autre type cellulaire. Néanmoins, suite à l'activation du récepteur AT₁, deux phosphatases semblent activées, l'une étant PTP-1D, une tyrosine phosphatase exprimée de façon constitutive dans les cellules, et l'autre, MKP-1, une phosphatase à double spécificité dont l'expression n'est induite qu'après plusieurs minutes de stimulation et dont il sera donc question dans la section traitant de la signalisation tardive.

3.3.5.1 SHP-2

Récemment, l'équipe de Marrero démontrait que dans les CMLV, le niveau de phosphorylation sur tyrosine ainsi que la stimulation de l'activité phosphatase de PTP-1D étaient augmentés par l'Ang II (Ali et al., 1997a). La PTP-1D (proteintyrosine phosphatase 1D), aussi appelée SHP-2, SH-PTP2, SH-PTP3, PTP2C ou Syp, est une tyrosine phosphatase cytoplasmique ayant deux domaines SH2 et impliquée dans la signalisation de plusieurs récepteurs tyrosine kinase dont celui de l'insuline. Ainsi, après une courte stimulation, SHP-2 s'associe par ces domaines SH2 à plusieurs tyrosine kinases, et devient par le fait même phosphorylée sur tyrosine. Cet événement conduit dans certains cas à l'association de cette phosphatase avec Grb2 et de ce fait, des études démontrent maintenant un rôle important de SHP-2 dans l'activation de p21^{ras} et de la voie des ERKs (Milarski et Saltiel, 1994; Noguchi et al., 1994; Yamauchi et al., 1995). Dans les CMLV, il semble que SHP-2 s'associe plutôt avec la protéine adaptatrice IRS-1, laquelle est également phosphorylée sur tyrosine après stimulation par l'Ang II (Ali et al., 1997a). Ces événements moléculaires, ainsi que le rôle de SHP-2 dans les effets de l'Ang II, restent cependant à préciser.

3.3.6 L'échangeur Na⁺/H⁺

L'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺ semble être un événement précoce qui accompagne l'induction de la croissance cellulaire dans plusieurs type cellulaire. Ainsi, des facteurs de croissance puissants comme le PDGF-BB induisent une alcalinisation rapide du cytoplasme des CMLV grâce à l'activation de cet échangeur (Rao et al.,

1990). Pour ce qui est des effets de l'Ang II, les résultats sont contradictoires. En effet, des équipes ont démontré une alcalinisation nette des CMLV après traitement à l'Ang II (Berk et al., 1987; Hatori et al., 1987; Lyall et al., 1988) alors que d'autres ont observé plutôt une acidification du milieu intracellulaire (Rao et al., 1990), ce qui va à l'encontre d'une activation de l'échangeur Na^+/H^+ . Il est important de mentionner cependant que, contrairement au facteur mitogénique PDGF-BB, l'Ang II est incapable d'induire la transcription des ARNm codant pour l'échangeur Na^+/H^+ (Rao et al., 1990). Des études sont donc encore essentielles afin de démontrer de façon certaine une activation de cet échangeur par l'Ang II. Si ceci s'avère être le cas, le rôle exact de ce dernier devra être évalué dans les effets trophiques de l'hormone dans les CMLV.

3.3.7 Le système d'oxydation NADH/NADPH

Une incubation des CMLV en présence d'Ang II induit également l'activation du système d'oxydation NADH/NADPH aboutissant à une augmentation de la génération de superoxydes (Griendling et al., 1994). Des radicaux libres comme les superoxydes ont plusieurs effets sur les fonctions cellulaires: l'induction de la croissance, la régulation des activités kinases, la peroxydation des lipides etc... (Hodgson et Fridovich, 1975; Freeman et Crapo, 1982; Larsson et Cerutti, 1988; Rao et Berk, 1992). Donc, les superoxydes et leurs métabolites peuvent agir en tant que seconds messagers précoces et tardifs, et une étude récente suggère un rôle essentiel d'un effecteur du système d'oxydation NADH/NADPH, $\text{p}22^{\text{phox}}$, dans les effets hypertrophiques de l'Ang II dans les CMLV (Ushio-Fukai et al., 1996). Des données suggèrent également un rôle de la PLD ainsi que la PLA_2 dans l'activation de ce système d'oxydation par l'Ang II, puisque l'activité de ce système est augmentée lorsque les CMLV sont incubées en présence des acides phosphatidique et arachidonique, les produits respectifs de ces phospholipases (Griendling et al., 1994; voir section sur PLA_2 et PLD).

3.4 Signalisation tardive

La totalité des mécanismes de signalisation décrit dans la section précédente se produisent dans un délai maximal de 15 minutes après une stimulation par l'Ang II. Cette hormone induit également des événements de signalisation qui requièrent plusieurs heures de stimulation avant d'être observables et quantifiables. Normalement,

ces mécanismes impliquent la transcription de gènes spécifiques dont le rôle pour certains dans les effets hypertrophiques de l'Ang II reste à préciser.

3.4.1 L'expression des gènes précoces

3.4.1.1 Les facteurs de transcription

En général, l'induction des gènes précoces est modulée par des modifications post-traductionnelles de facteurs de transcription pré-existants (voir Elk-1 comme exemple dans la section sur les ERKs et Edwards, 1994). Cependant, parmi les effets à long terme de l'Ang II, plusieurs équipes dont la nôtre ont démontré l'induction de l'expression de certains gènes précoces encodant des facteurs de transcription dans les CMLV. Ainsi, dans une fenêtre de 30 à 120 minutes post-stimulation, l'Ang II induit l'expression des ARNm de trois différentes classes de facteurs de transcription: 1) *c-fos* et *c-jun* (gènes membres de la classe "leucine zipper"), 2) *egr-1* (gène membre de la classe "zinc finger"), et 3) *c-myc* (gène de la classe "helix-loop-helix") (Kawahara et al., 1988; Taubman et al., 1989; Naftilan et al., 1989a; Naftilan et al., 1989b; Naftilan et al., 1990; Sachinidis et al., 1992a). Bien que certains de ces facteurs de transcription permettent la réentrée des cellules quiescentes dans le cycle cellulaire (transition G₀-G₁, voir plus bas) (Nishikura et Murray, 1987) et que l'inhibition antisens de *erg-1* dans les cardiomyocytes inhibe l'action trophique de l'ET-1 (Neyses et al., 1991), le rôle spécifique de ces facteurs de transcription dans l'effet trophique de l'Ang II reste à préciser. L'expression de la plupart de ces facteurs de transcription est induite par une multitude de facteurs de croissance (PDGF-BB, bFGF, EGF...) mais l'un d'entre-eux, *fos B*, est induit spécifiquement par la thrombine, un facteur hypertrophique dans les CMLV pulmonaires (Rothman et al., 1994). Ce résultat, bien qu'intéressant, ne donne pour l'instant qu'un rôle de marqueur d'hypertrophie pour *fos B* dans ce type de cellules. L'Ang II induit également l'expression de *fos B* dans les CMLV (Servant et Meloche, résultats non-publiés), mais son rôle et celui des autres facteurs de transcription reste à définir. Plusieurs données suggèrent néanmoins que ces facteurs sont impliqués dans l'expression de gènes tardifs, qui eux ont des rôles bien précis. Ainsi, il est bien connu que les protéines de la famille Fos (c-Fos, Fos B) forment des homodimères ou des hétérodimères avec la famille des protéines Jun (c-Jun, Jun B), augmentant ainsi leur affinité de liaison pour les sites TRE des promoteurs de certains gènes dont l' α -actine, la chaîne légère de la myosine, le TGF- β et ET-1 (Iwaki et al., 1990; Kim et al., 1990; Lee et al., 1991; Bishopric et al., 1992). Comme cela a déjà été

mentionné dans les paragraphes précédents, les produits de ces gènes sont tous sans exception des candidats potentiels pouvant avoir un rôle direct ou indirect dans les effets trophiques de l'Ang II.

3.4.1.2 La phosphatase des MAP kinases: MKP-1

Nous avons vu précédemment que les ERKs sont activées dans une séquence temporelle faisant intervenir une cascade de kinases bien caractérisée (voir section sur les ERKs). L'inactivation de cette voie est cependant moins bien comprise. Néanmoins, une nouvelle famille de protéine phosphatases à double spécificité, donc capables de déphosphoryler les résidus thréonine et tyrosine des MAP kinases a récemment été identifiée (Keyse, 1995). *3CH134* fut le premier gène de mammifère (souris) appartenant à cette famille à être découvert, son homologue chez l'humain étant *CL100* (Keyse et Emslie, 1992; Zheng et Guan, 1993). Le produit de ces deux gènes est une protéine appartenant à la famille des gènes précoces appelé MKP-1 (MAP kinase phosphatase-1) (voir tableau II). L'expression de cette dernière est donc absente dans les cellules quiescentes et, après une exposition aux facteurs de croissance ou à des stress environnementaux, les différentes équipes observent une expression rapide et transitoire de l'ARNm qui est indépendante de l'activité de la machinerie traductionnelle (pour en savoir davantage sur la régulation de l'expression de MKP-1, voir l'article de Scimeca et al. en annexe). Du point de vue fonctionnel, la surexpression de MKP-1 dans les cellules COS conduit à la déphosphorylation et à l'inactivation des ERKs, et la forme catalytiquement inactive de MKP-1 s'associe de façon spécifique avec la forme phosphorylée des ERKs (Sun et al., 1993). De plus, l'expression de MKP-1 est également impliquée dans l'inhibition de l'activité d'un gène rapporteur dépendant des ERKs (Sun et al., 1994c; Brondello et al., 1995). Tous ces résultats et bien d'autres démontrent une implication possible de MKP-1 dans l'inactivation des ERKs. Comme cela a été mentionné dans les paragraphes précédents, une stimulation des CMLV par l'Ang II conduit à l'activation des ERKs de façon rapide mais transitoire (après 30 minutes de stimulation, retour aux valeurs basales) d'où l'hypothèse d'une phosphatase impliquée dans l'inactivation des ERKs. Bien que quelques études démontrent maintenant que l'Ang II induit l'expression de MKP-1 dans les CMLV, cette dernière n'est sûrement pas impliquée dans l'inactivation rapide des ERKs car son expression n'est observable que seulement après 1 heure de stimulation (Duff et al., 1993; Scimeca et al., 1997). Ainsi le rôle de cette phosphatase

dans la signalisation cellulaire dépendante de l'Ang II reste à préciser et la porte est toujours ouverte pour d'autres effecteurs impliqués dans l'inactivation des ERKs.

3.4.2 Les gènes tardifs

Contrairement aux gènes précoces qui sont activés après seulement quelques heures de stimulation, les gènes tardifs ne sont quant à eux activés qu'après plusieurs heures et sont dépendants d'une activité traductionnelle (néosynthèse protéique afin d'induire leur transcription).

3.4.2.1 Exemples de l' α -actine, du TGF- β , du bFGF et de la chaîne A du PDGF

Plusieurs études ont démontré qu'une stimulation prolongée des CMLV par l'Ang II (> 6 heures de stimulation) induisait l'expression de plusieurs protéines dont l' α -actine, le TGF- β le bFGF et la chaîne A du PDGF (Naftilan et al., 1989a; Hahn et al., 1991; Turla et al., 1991; Gibbons et al., 1992; Itoh et al., 1993). Comme mentionné dans un paragraphe précédent, l'induction de l'expression de l' α -actine peut se faire de façon dépendante de l'expression des gènes précoces par la formation des complexes AP-1 (hétérodimère entre Fos et Jun). L'expression de l' α -actine semble être une des composantes majeures de l'effet hypertrophique de l'Ang II dans les CMLV (Turla et al., 1991). Identifier les mécanismes impliqués dans l'activation du gène codant pour cette protéine permettra certainement de cibler de façon précise les voies de signalisations nucléaires stimulées par l'Ang II et impliquées dans l'effet trophique de cette hormone.

Pour l'instant, le rôle physiologique de la production du PDGF-AA, du TGF- β et du bFGF par l'Ang II est encore incertain. Un effet autocrine est probable pour le bFGF et le TGF- β car les récepteurs de ces deux facteurs sont exprimés dans les CMLV. De plus, quelques études impliquent ces hormones dans la réponse phénotypique des CMLV face à l'Ang II. Effectivement, il a été démontré que le TGF- β inhibe la prolifération des CMLV en réponse au sérum (Owens et al., 1988). Selon la capacité de ces cellules à produire du TGF- β (CMLV dérivées de rats de 6 semaines et qui produisent du TGF- β , ou CMLV dérivées de rats matures (3 mois), qui ne produisent pas de TGF- β), l'Ang II aura des effets hypertrophiques ou hyperplasiques respectivement (Koibuchi et al., 1993). Les effets hyperplasiques de l'Ang II seraient

en partie induits par la production de bFGF, d'où l'hypothèse voulant que la réponse phénotypique des CMLV face à l'Ang II serait la résultante d'un équilibre entre les effets inhibiteurs du TGF- β et ceux mitogéniques du bFGF. Pour ce qui est du PDGF-AA, sa production dépendante de l'Ang II doit avoir plutôt des effets paracrines sur d'autres types cellulaires environnants (cellules endothéliales des vaisseaux par exemple) car les CMLV n'exprime pas le récepteur du PDGF-AA et de ce fait ne répondent aucunement à une stimulation exogène de PDGF-AA (Koibuchi et al., 1993; Stouffer et al., 1993)

3.4.2.2 Le système y^+

Un apport en acides aminés est nécessaire pour la synthèse de nouvelles protéines ou lors d'une augmentation de la vitesse de la synthèse protéique globale. Bien que les cellules eucaryotes aient la capacité de synthétiser quelques acides aminés, plusieurs sont de source exogène (acides aminés non-essentiels vs essentiels), et les cellules sont donc équipées de transporteurs membranaires spécialisés dans le transport des acides aminés. Cette donnée a poussé une équipe de la Nouvelle-Zélande à vérifier si l'Ang II augmentait le transport d'acides aminés cationiques dans les CMLV (Low et Grigor, 1995). Leurs résultats démontrent que l'octapeptide stimule une incorporation importante d'arginine et de lysine après 24 heures de stimulation, un effet significativement différent des valeurs basales débutant 6 heures après l'exposition à l'Ang II. L'incorporation de ces acides aminés est inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs des machineries transcriptionnelles et traductionnelles (actinomycine D et cycloheximide) suggérant un rôle de l'Ang II dans l'activation de certains gènes impliqués dans le transport des acides aminés. Finalement, des expériences de cinétique d'incorporation d'acides aminés radioactifs, corrélées avec l'apparition des ARNm CAT-1 et CAT-2 (composantes majeures du système y^+) étayent l'hypothèse que l'Ang II stimule le système y^+ , lequel est impliqué dans le transport des acides aminés cationiques à travers la membrane plasmique (Low et Grigor, 1995). Bien que ces résultats soient préliminaires, ils démontrent que, suite à une exposition de longue durée, l'Ang II stimule l'incorporation d'acides aminés essentiels, une étape déterminante dans les phénomènes hypertrophiques associés à l'hormone.

3.5 L'insuline, un facteur de croissance majeur dans la régulation de la synthèse protéique

Les effets physiologiques de l'insuline sont bien caractérisés au niveau du contrôle de l'homéostasie des niveaux du glucose sanguin. Ces dernières années, plusieurs études ont également démontré que cette hormone est un facteur de croissance, ayant des effets importants au niveau de la synthèse protéique dans plusieurs cellules cibles dont les fibres musculaires, les hépatocytes et les adipocytes (Kimball et al., 1994). Bien que cette hormone se lie à un récepteur tyrosine kinase, tout comme l'Ang II, l'insuline augmente le taux global de synthèse protéique en influençant l'activité des machineries transcriptionnelle et traductionnelle. Ainsi, plusieurs effecteurs cytoplasmiques et nucléaires sont empruntés par ces deux systèmes afin d'induire la synthèse protéique dans les cellules cibles. Comme pour ce qui est de l'Ang II, l'insuline induit la phosphorylation sur résidu tyrosine de quelques protéines adaptatrices telles que Shc et IRS-1. Bien que ceci reste à démontrer clairement pour l'Ang II, des études démontrent que ces protéines adaptatrices sont essentielles à l'insuline afin d'induire la synthèse protéique (Proud et Denton, 1997). Ces protéines adaptatrices sont responsables de la transmission d'un signal membranaire (activation du récepteur à l'insuline) vers deux voies distinctes de signalisation: la cascade Ras/Raf/MEK/Erk et la voie de la PI3-kinase et ses effecteurs (voir sections précédentes). L'activation de ces deux voies par l'insuline, tout comme l'Ang II, est associée à une augmentation du taux de synthèse protéique dans les cellules cibles (Proud et Denton, 1997). Le parallèle entre ces deux systèmes se retrouve également au niveau nucléaire. Effectivement, le système de transcription par l'ARN polymérase I, permettant la biosynthèse des ARN ribosomiques, est affecté par l'insuline qui active, tout comme l'Ang II, le facteur de transcription UBF, un activateur spécifique du système de l'ARN polymérase I (Gingras et Donzé, 1995; Hershey et al., 1995). Outre ces évidences, les effets de l'insuline au niveau de l'augmentation de la synthèse protéique sont de loin plus caractérisés que ceux de l'Ang II. Ainsi cette hormone agit à plusieurs niveaux tels que: l'apport en acides aminés, la stabilité et la traduction (initiation et élongation) des ARNm, dans le transport des ARNm matures du noyau vers le cytoplasme et sur l'activité des ARN polymérases I et II (Gingras et Donzé, 1995). Ce modèle qu'est l'insuline représente donc un candidat de choix dans le but d'étudier et de prédire quels sont les mécanismes moléculaires qu'utilise l'Ang II afin d'induire la synthèse protéique dans les CMLV.

4.0 Angiotensine II: hypertrophie vs hyperplasie

Les paragraphes précédents démontrent que l'Ang II a la capacité de stimuler plusieurs voies de signalisation, qui, dans les CMLV, convergent de façon ultime vers la régulation de l'activité des machineries transcriptionnelle et traductionnelle, conduisant ainsi au phénomène d'hypertrophie des CMLV. Cependant, plusieurs données démontrent qu'un mitogène puissant comme le PDGF-BB, stimule des voies de signalisation communes à celles activées par l'Ang II (Linseman et al., 1995). Effectivement, outre la capacité de ce facteur de croissance à activer des récepteurs de type tyrosine kinase, donc très différent des mécanismes de signalisation précoces des récepteurs à sept domaines transmembranaires, une stimulation des CMLV par le PDGF-BB induit l'activation des ERKs, de la p70^{s6k}, de la PI3-kinase, des tyrosine kinases comme Src, ainsi que l'expression de gènes précoces (Claesson-Welsh, 1994). Or toutes ces voies sont, comme résumé plus haut, stimulées également par l'Ang II. Cette observation engendre une question fondamentale pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse phénotypique des CMLV face aux facteurs de croissance vasculaire comme l'Ang II et le PDGF-BB. Pourquoi un facteur hypertrophique comme l'Ang II n'est pas un facteur hyperplasique comme le PDGF-BB? Ou pourquoi l'Ang II n'est-elle pas capable d'induire la synthèse d'ADN et la division des CMLV? Afin de répondre à cette question, deux types d'études comparatives entre les effets de l'Ang II et du PDGF sont envisageables: 1) étudier les cinétiques d'activation et l'efficacité du PDGF pour différentes voies de signalisation et les comparer à l'Ang II. Il a été démontré dans quelques systèmes que l'efficacité, de même que la durée d'activation d'une voie de signalisation particulière, peut influencer de façon importante la réponse cellulaire (Marshall, 1995). Il est donc possible d'envisager que l'Ang II puisse activer que de façon transitoire certaines voies qui doivent être activées de façon soutenue afin d'induire la synthèse d'ADN, comme par exemple les ERKs (Pages et al., 1993; Meloche, 1995). Cependant, ce type d'étude ne répond que partiellement à la question. Effectivement, bien qu'il soit fort possible que l'Ang II et le PDGF-BB régulent de façon différente certaines voies de signalisation, le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) directement dans l'absence d'effet mitogénique de l'Ang II dans les CMLV restent toujours à caractériser. Cette affirmation nous amène donc à la deuxième voie envisageable: 2) étudier l'action de ces deux facteurs de croissance sur les effecteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. L'Ang II n'induisant aucune synthèse d'ADN dans les CMLV, il est fort probable que ce peptide module de façon différente certains effecteurs du cycle

cellulaire comparativement au PDGF-BB. Cette dernière hypothèse est l'approche que nous avons initialement choisie. Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article dont je suis le premier auteur.

4.1 Le cycle cellulaire

Comme le démontre la figure 5 (page 60), le cycle cellulaire est divisé en quatre phases distinctes. Par défaut, la phase qui précède l'entrée en phase S, où il y a réplication du matériel génétique de la cellule, est appelée Gap₁ ou G₁. La phase G₂ ou Gap 2 suit la période de synthèse d'ADN et précède la phase M où il y a mitose ou division du matériel génétique, du cytoplasme ainsi que des membranes biologiques afin de donner deux cellules filles. C'est en phase G₁ du cycle que, selon l'environnement cellulaire (présence de facteurs de croissance, présence de substances inhibant la croissance, l'état de confluence, etc...), et l'état même de la cellule (taille de la cellule, état du matériel génétique, etc...), la décision se prend quant au devenir de la cellule. Ainsi, quatre choix s'offrent à une cellule en phase G₁: 1) continuer en phase S si les points de contrôle ou "check points" ont été passés en G₁, 2) s'arrêter en phase G₁ afin de permettre à la cellule de réparer son matériel génétique suite à une exposition prolongée aux ultra-violets par exemple, 3) retourner en quiescence (sortir du cycle cellulaire, appelée également phase G₀), si par exemple il n'y a pas de facteurs de croissance dans l'environnement immédiat de la cellule et 4) sortir également du cycle cellulaire pour entrer dans d'autres phases comme la différenciation ou l'apoptose. Comme mentionné plus haut, la cellule s'est dotée de points de contrôle ou "check points" en phase G₁ afin de permettre ou non la transition des cellules en G₁ vers la phase S. Ainsi, d'un point de vue morphologique, la cellule doit augmenter sa taille en prévision du doublement du matériel génétique en phase S et de sa division en phase M. Cette augmentation de la taille se fait, en autres, par une augmentation globale de la synthèse protéique qui est dépendante directement de la présence de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire. Cette synthèse est également spécifique car certaines de ces protéines seront impliquées directement dans le contrôle biochimique des étapes menant à la synthèse d'ADN (voir plus bas, les cyclines par exemple). Un autre point de contrôle important en G₁ est l'intégrité du matériel génétique. Effectivement, si pour une raison ou une autre, le matériel génétique est endommagé, des processus biochimiques freineront la progression en G₁ et permettront ainsi à la cellule de synthétiser les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. Du point de vue temporel, ces points de contrôle se retrouvent tous en amont d'un point de non-

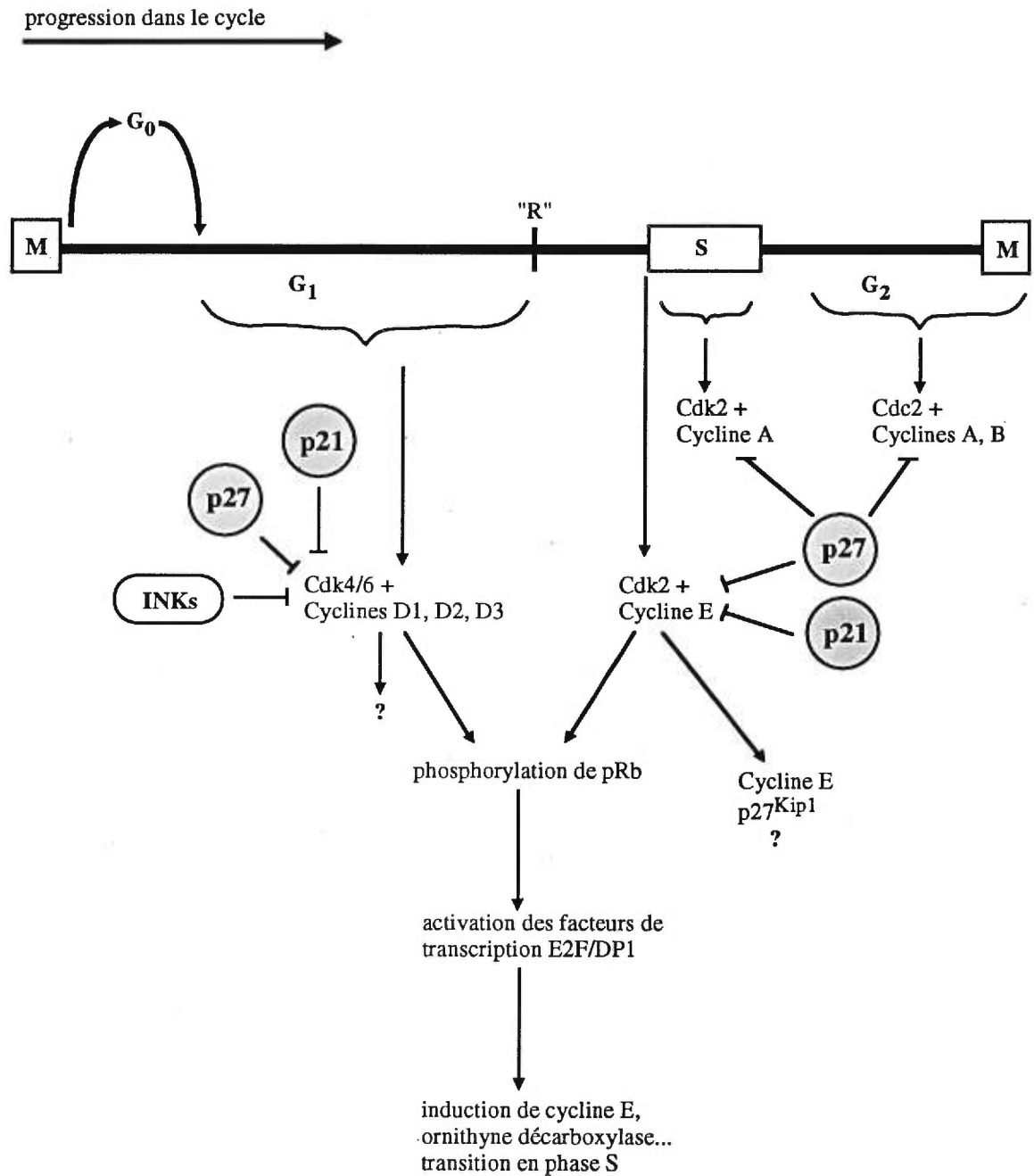


Figure 5: Les phases du cycle cellulaire et les différents effecteurs impliqués dans la transition des différentes phases. Voir le texte pour les abréviations.

retour ou "restriction point, R" à la fin de la phase G_1 (voir figure 5). Lorsque les cellules ont passé ce point, elles sont destinées à terminer un cycle cellulaire complet (réplication du matériel génétique ainsi que division cellulaire) et leur dépendance en facteur de croissance est grandement réduite. Ces caractéristiques temporelles, morphologiques et qualitatives ont permis ainsi aux chercheurs de classer les facteurs de croissance en trois familles (Stiles et al., 1979): 1) la famille des facteurs de croissance ayant la capacité de permettre un passage de la quiescence vers la phase G_1 (transition G_0 - G_1) sans permettre une progression au-delà du point de non-retour en fin G_1 , empêchant ainsi une transition en phase S. Ces facteurs ont été classés sous la terminologie de facteur de compétence. Ils ont effectivement la compétence de permettre un retour des cellules dans la phase G_1 du cycle cellulaire; 2) la famille des facteurs de croissance qui permettent seulement la transition G_1 -S des cellules. Ces facteurs n'ont cependant pas la capacité de permettre un retour des cellules dans le cycle (transition G_0 - G_1) et ils sont donc appelés facteurs de progression, permettant une progression des cellules en phase G_1 vers la phase S; 3) finalement, les facteurs de croissance qui ont la capacité d'être à la fois un facteur de compétence et de progression. Ils sont appelés mitogènes car ils ont la capacité de stimuler la synthèse d'ADN et la division cellulaire de cellules quiescentes. Pour ces raisons, le PDGF-BB est un mitogène pour les CMLV alors que l'Ang II est, comme nous le verrons (voir section résultats), un facteur de compétence dans ce modèle, permettant un retour des cellules dans le cycle sans pour autant permettre une progression au-delà du point de non-retour.

Du point de vue biochimique, la progression en phase G_1 de même que la transition G_1 -S est de loin plus complexe. L'activation de deux familles de kinases appelées "cyclin-dépendent kinases 4/6 et 2" ou Cdk4/6 et Cdk2 est essentielle pour la transition des cellules vers la phase S (Koff et al., 1992; Tsai et al., 1993; van den Heuvel et Harlow, 1993; Knoblich et al., 1994; Matsushime et al., 1994; Ohtsubo et al., 1995; Krude et al., 1997; Lundberg et Weinberg, 1998).

4.2 Les Cdks et les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de leur activité

Les paragraphes qui suivent décrivent essentiellement les effecteurs impliqués dans la progression en G_1 et la transition G_1 -S du cycle, car c'est obligatoirement à ces niveaux que le PDGF-BB module de façon différente les effecteurs du cycle comparativement à l'Ang II, cette dernière n'étant pas capable d'induire la réplication

du matériel génétique dans les CMLV. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, la présence de facteurs de croissance est essentielle avant le point de non-retour afin que les cellules augmentent leur taille et synthétisent les effecteurs requis pour la transition de ces dernières vers la phase S. Un des effecteurs essentiels du cycle sont les cyclines, principaux régulateurs de l'activité des Cdks.

4.2.1 Les Cdks et les cyclines

Les "cyclin-dependent kinases" ou Cdks sont des sérine/thréonine kinases dont la principale caractéristique est la régulation de leur activité par la liaison à des sous-unités régulatrices, les cyclines. Pour l'instant, sept Cdks ont été clonées et caractérisées. Deux d'entre elles, Cdk4 et Cdk2, sont impliquées dans la progression en G_1 et la transition G_1 -S respectivement (voir Fig. 5). Il est à noter qu'une autre kinase appelée Cdk6, qui est exprimée exclusivement dans les lignées hématopœiétiques, est l'homologue de Cdk4. L'association spécifique de ces Cdks monomériques avec les cyclines est une étape essentielle à l'obtention d'une activité kinase. L'expression des Cdks est constitutive dans la plupart des systèmes. Cependant, les cyclines sont, comme le nom l'indique, des protéines dont l'expression oscille dans les différentes phases du cycle. Deux types de cyclines, les cyclines D et la cycline E, sont impliquées dans la progression en G_1 et la transition vers la phase S (voir Fig. 5). Suite à la stimulation de cellules quiescentes par des facteurs de croissance et le retour de celles-ci dans le cycle (transition G_0 - G_1), ces cellules synthétisent premièrement les cyclines de type D, qui comptent trois isoformes, D1, D2 et D3 (voir Fig. 5). Ces cyclines D sont les sous-unités régulatrices de Cdk4 et leur expression, qui est maximale en milieu de G_1 , corrèle également avec une activité maximale de Cdk4 dans cette période. Contrastant avec l'expression des cyclines D, qui une fois induite reste élevée dans toutes les phases du cycle, l'expression de la cycline E est maximale, rapide et transitoire en transition G_1 -S. Cette cycline s'associe spécifiquement avec la kinase Cdk2, d'où une activité enzymatique qui corrèle également avec l'expression maximale de sa sous-unité régulatrice. Le niveau d'expression de ces cyclines résulte d'un contrôle de l'activité des processus biochimiques impliqués dans leur synthèse (surtout transcriptionnels) et dans leur destruction (séquences déstabilisantes ou modifications post-traductionnelles). Ce sont des mécanismes essentiels dont la cellule s'est dotée afin de contrôler l'activité des Cdks et ainsi empêcher une transition vers la phase S, ou d'orchestrer de façon précise l'entrée des cellules vers cette dernière. Un des substrats physiologiques de ces

complexes cyclines-Cdks est le produit du gène du rétinoblastome, pRb, un supresseur de tumeur. pRb, sous sa forme hypophosphorylée, séquestre dans son "binding pocket" des facteurs de transcription de la famille E2F-DP. Ces derniers sont responsables de la transcription de gènes, dont le gène de la cycline E, essentiels pour la progression dans le cycle cellulaire. Suite à l'activation de Cdk4 et de Cdk2, ces derniers phosphorylent pRb sur plusieurs résidus sérine et thréonine et c'est sous cette forme hyperphosphorylée que pRb induit la libération des facteurs de transcription. Ainsi, Cdk4 de même que Cdk2 sont responsables de l'inactivation de pRb par phosphorylation (voir Fig. 5) (Lundberg et Weinberg, 1998). Des données récentes suggèrent également la possibilité que Cdk2 aurait d'autres substrats physiologiques dont la cycline E et l'inhibiteur p27^{Kip1} (voir plus bas) dont la phosphorylation entraînerait leur dégradation par la voie ubiquitine-protéasome (Clurman et al., 1996; Won et Reed, 1996; Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997). Pour cette raison, la cellule a plusieurs façons de moduler l'activité de ces Cdks.

4.2.2 La phosphorylation et la déphosphorylation des Cdks

L'activité des Cdks est également modulée par des modifications covalentes d'ordre post-traductionnel, la phosphorylation. En effet, bien que la liaison aux cyclines soit déterminante dans l'obtention d'une activité kinase, la phosphorylation sur un résidu thréonine (Thr) spécifique est également requise afin d'avoir une activité kinase complète (voir figure 6, page 65). Ainsi, dans la forme active des complexes Cdks-cyclines, Cdk4 et Cdk2 sont phosphorylées sur les résidus Thr¹⁷² et Thr¹⁶⁰ respectivement (Gu et al., 1992; Kato et al., 1994a). Cette phosphorylation est accomplie par une autre sérine/thréonine kinase appelée CAK (Cdk-activating kinase). Durant un cycle cellulaire normal, la phosphorylation de Cdk2 par exemple a tendance à augmenter et diminuer en parallèle avec sa liaison à la cycline E. Ces changements de phosphorylation ne sont pas dus à l'activité de CAK, qui ne semble pas être modulée dans le cycle (Sclafani, 1996), mais sembleraient refléter l'aptitude de la liaison des cyclines à stimuler la phosphorylation des Cdks par CAK (Morgan, 1995). Les résidus Thr¹⁴ et Tyr¹⁵ constituent d'autres sites possibles de régulation de l'activité par phosphorylation. Contrairement aux sites phosphorylés par CAK, ces sites, lorsqu'ils sont phosphorylés par une tyrosine kinase de type Wee 1 (ainsi que par une thréonine kinase peu caractérisée) inhibent l'activité des Cdks (voir Fig. 6) (Lees, 1995). La déphosphorylation de ces sites (Thr¹⁶⁰, Thr¹⁷², Thr¹⁴ et Tyr¹⁵) est également impliquée dans la régulation du cycle. Des phosphatases à double spécificité

comme Cdc25 ont été caractérisées et ont la capacité d'activer les Cdks par déphosphorylation de la Thr¹⁴ et de la Tyr¹⁵ (voir Fig. 6) (Lees, 1995). Une autre phosphatase à double spécificité appelée KAP ou Cdi1 (Cdk-associated phosphatase) (Gyuris et al., 1993; Hannon et al., 1994a; Poon et Hunter, 1995) a la capacité de déphosphoryler la Thr¹⁶⁰ de Cdk2 en l'absence de cyclines *in vitro*. Ce dernier résultat indique donc un rôle double de la liaison de la cycline E à Cdk2: 1) augmenter la phosphorylation de la Thr¹⁶⁰ par CAK et 2) inhiber la déphosphorylation de ce résidu par KAP.

4.2.3 Les inhibiteurs des Cdks

Outre leur liaison à des cyclines et leur état de phosphorylation, l'activité des Cdks est également modulée de façon importante par la présence d'inhibiteurs des Cdks appelés "cyclin-dependent kinase inhibitors" ou CKIs. Ces molécules sont regroupées au sein de deux familles génétiquement distinctes (voir tableau III, page 66).

4.2.3.1 Les protéines Ink4

La famille des protéines Ink4 regroupe 4 membres: p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} et p19^{Ink4d} (Serrano et al., 1993; Guan et al., 1994; Hannon et Beach, 1994b; Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995). Ces inhibiteurs sont spécifiques de Cdk4/Cdk6, inhibant l'activité de ces enzymes de façon compétitive pour la liaison avec les cyclines D. Ils se lient à la forme monomérique et empêchent la formation des complexes Cdk4/Cdk6-cyclineD. Ils peuvent également lier les complexes Cdk4-cycline D pour former un complexe ternaire catalytiquement inactif (pour revue voir Sherr et Roberts, 1995). Plusieurs études ont été entreprises afin de déterminer le rôle précis de ces inhibiteurs dans la transition G₁-S du cycle. Nous citerons ici comme exemple les deux membres les plus caractérisés de cette famille, p16^{Ink4a} et p15^{Ink4b}.

4.2.3.1.1 p15^{Ink4b}

Des études ont démontré qu'un traitement de cellules épithéliales au TGF-β induit l'expression de p15^{Ink4b} (Hannon et Beach, 1994b; Reynisdottir et al., 1995). Ces résultats suggèrent fortement que cet inhibiteur est impliqué dans les effets anti-prolifératifs de cette cytokine. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, l'induction de p15^{Ink4b} induit la liaison de ce dernier à la forme monomérique de Cdk4

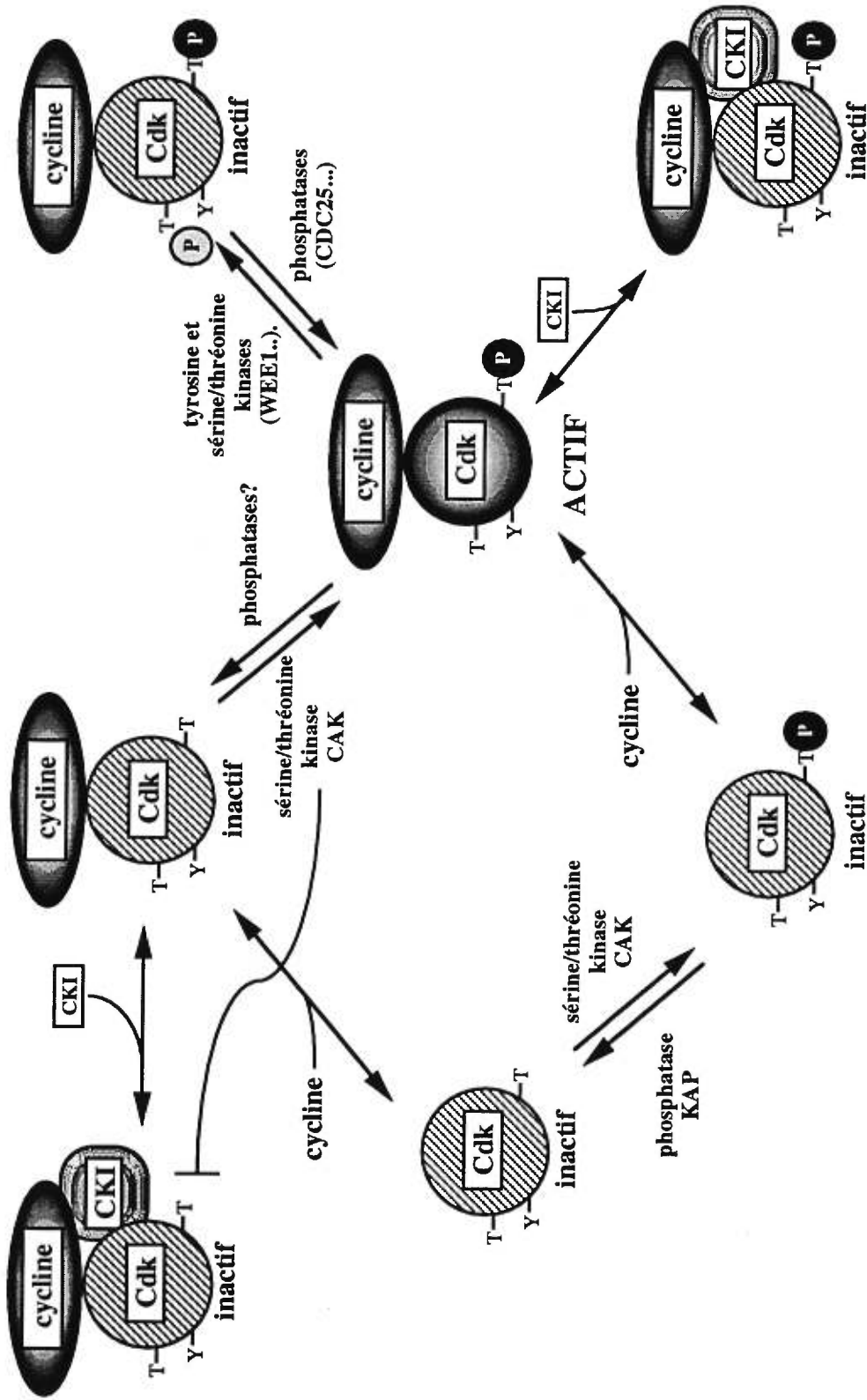


Figure 6: Régulation de l'activité enzymatique des Cdk. Pour les abréviations, se référer au texte. Schéma tiré et modifié de la référence "Morgan, 1995".

Tableau III: Inhibiteurs des Cdks

	M_r	localisation chromosomique (humain)	cibles	rôles
<u>famille Ink4</u>				
p16 ^{Ink4a}	16,000	9p21	Cdk4/6	inhibent la formation des complexes avec les cyclines D ou inhibent l'activité kinase des complexes fonctionnels
p15 ^{Ink4b}	15,000	9p21		
p18 ^{Ink4c}	18,000	1p32		
p19 ^{Ink4d}	19,000	19p13		
<u>famille Cip/Kip</u>				
p21 ^{Cip1}	21,000	17 (souris)	Cdk4/6 et Cdk2	inhibent l'activité kinase des complexes fonctionnels ou inhibent la phosphorylation impliquée dans l'activation des Cdks
p27 ^{Kip1}	27,000	12p12		
p57 ^{Kip2}	57,000	11p15		

ou aux complexes Cdk4-cyclines D. Cependant, l'inhibition de l'activité enzymatique des complexes Cdk4-cyclines D par p15^{Ink4b} ne semble pas être le seul mécanisme impliqué dans l'arrêt des cellules en phase G₁. En effet, l'action combinée de deux CKIs est responsable de cette arrêt. Plusieurs modèles cellulaires démontrent aujourd'hui qu'un autre inhibiteur du cycle, p27^{Kip1} (voir plus bas) est lié de façon prédominante aux complexes Cdk4-cycline D sans toutefois inhiber l'activité enzymatique de ces derniers (Zhang et al., 1994; Poon et al., 1996; Soos et al., 1996; Vlach et al., 1996; Blain et al., 1997). Or ces complexes Cdk4-cyclines D serviraient donc de réservoir de p27^{Kip1} qui, sous certaines conditions, permettraient une redistribution de cet inhibiteur vers sa cible principale, les complexes Cdk2-cycline E. Une de ces conditions est l'induction de p15^{Ink4b}. Ainsi, la production de complexes Cdk4-cycline D-p15^{Ink4b} par le TGF-β ou dans un modèle inductible, empêche la liaison de p27^{Kip1} aux complexes Cdk4-cycline D (la liaison de p15^{Ink4b} et p27^{Kip1} avec ces complexes étant mutuellement exclusive, Reynisdottir et al., 1995; Reynisdottir et Massagué, 1997). Les complexes Cdk4-cycline D-p15^{Ink4b} ne pouvant pas servir de réservoir de p27^{Kip1}, ce dernier est redistribué vers les complexes Cdk2-cycline E, inhibant ainsi l'activité enzymatique de ces derniers et la transition des cellules en phase S (Reynisdottir et al., 1995; Reynisdottir et Massagué, 1997). Une étude ultérieure a également démontré qu'un traitement au TGF-β inhibe l'expression de Cdk4 (Ewen et al., 1993), décrivant ainsi un autre mécanisme par lequel cette cytokine empêche la formation de complexes de titration de p27^{Kip1}. Des analyses par RT-PCR ont démontré que l'ARNm du gène *Ink4b* est exprimé dans plusieurs tissus (du moins chez la souris) suggérant ainsi un rôle général de cet inhibiteur dans le contrôle de la transition G₁-S d'une grande majorité de cellules lorsque ces dernières sont exposées à des signaux anti-prolifératifs (Sherr et Roberts, 1995).

4.2.3.1.2 p16^{Ink4a}

Contrairement à p15^{Ink4b}, une induction de p16^{Ink4a} n'a pas encore été observée sous des conditions physiologiques ou pharmacologiques. De plus son expression semble se restreindre à seulement quelques tissus comme le poumon et la rate (Sherr et Roberts, 1995). Néanmoins, la perte d'expression de p16^{Ink4a} est un événement fréquent dans la tumorigénèse, d'où la classification de cet inhibiteur dans la famille grandissante des protéines supresseuses de tumeurs comme pRb et p53 font parti (Sherr et Roberts, 1995). Ainsi, la sur-expression de p16^{Ink4a} induit un arrêt un phase G₁ dans plusieurs lignées cellulaires (Sherr et Roberts, 1995). Ces résultats sont

en accord avec une étude récente démontrant que dans un modèle où p16^{Ink4a} est inductible, ce dernier lie Cdk4 et prévient la formation et donc l'activation des complexes Cdk4-cyclines D (Jiang et al., 1998). Cette étude démontre cependant que l'arrêt des cellules en G₁, par l'induction de p16^{Ink4a}, est indépendante de l'activité des complexes Cdk4-cycline D1. En effet, cette étude et une étude ultérieure ont démontré que l'expression d'une forme mutante de Cdk4, Cdk4^{N158} (mutation dans le site de liaison de l'ATP), qui inhibe l'activité endogène des complexes Cdk4-cycline D1, est incapable d'arrêter les cellules en phase G₁ (van den Heuvel et Harlow, 1993; Jiang et al., 1998). Ces résultats indiquent que 1) p16^{Ink4a} doit induire un arrêt du cycle de façon indépendante de l'activité kinase de Cdk4 et 2) que l'inhibition de l'activité kinase des complexes Cdk4-cycline D1 n'est pas suffisante pour arrêter les cellules en phase G₁. L'étude de Jiang et al propose donc un modèle similaire à celui décrit pour p15^{Ink4b} (voir plus haut). p16^{Ink4a} lie Cdk4 monomérique (contrairement à p15^{Ink4b} qui semble lier les complexes Cdk4-cyclines D) empêchant ainsi la formation de complexes Cdk4-cycline D1. La présence de p16^{Ink4a} empêche donc la formation des complexes de titration Cdk4-cyclines D-p27^{Kip1}. Ainsi, p27^{Kip1} se retrouve redistribué sur les complexes Cdk2-cycline E, inhibant l'activité kinase du complexe et la transition en phase S. Ces résultats suggèrent que même si p16^{Ink4a} inhibe de façon spécifique l'activité des complexes Cdk4-cycline D1, l'inhibition indirecte des complexes Cdk2-cycline E par p27^{Kip1} est requise pour un arrêt de croissance (Jiang et al., 1998).

4.2.3.2 Les protéines Cip/Kip

La deuxième famille d'inhibiteurs regroupe les protéines Cip et Kips et est constituée de trois membres: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} (El-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993; Noda et al., 1994; Toyoshima et Hunter, 1994; Polyak et al., 1994a; Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995). Contrairement à la famille précédente, ces inhibiteurs ont une fenêtre d'action plus large. Ils inhibent l'activité kinase de Cdk4/6 et de Cdk2 et semblent avoir une préférence pour les complexes Cdks-cyclines comparativement aux Cdks monomériques. Ils inhibent l'activité enzymatique des complexes Cdks-cyclines en se liant de façon stochiométrique à ces derniers et en masquant ainsi le site de liaison aux substrats, ou en empêchant la phosphorylation de ces complexes par CAK (voir Fig. 6 et tableau III) (pour revue voir Sherr et Roberts, 1995). Ces molécules

n'appartiennent pas à la famille des supresseurs de tumeurs car aucune mutation n'a été retrouvée dans les gènes codant pour ces protéines (Dahia et al., 1998).

4.2.3.2.1 p21^{Cip1}

p21^{Cip1} a été premièrement caractérisé comme un effecteur important du cycle qui agit en inhibant l'activité kinase des complexes Cdk2-cycline E de façon dépendante de l'expression de p53 lors d'un arrêt du cycle induit par des agents abîmant l'intégrité de l'ADN (irradiation- γ par exemple) (Sherr et Roberts, 1995). En effet, dans cette famille d'inhibiteur, p21^{Cip1} est le seul dont l'expression peut, sous certaines conditions, être modulée par le facteur de transcription p53. De plus, la reconstitution de la protéine purifiée avec plusieurs différents complexes Cdks-cyclines *in vitro*, l'inhibition de la croissance cellulaire lors de sa sur-expression dans les cellules de mammifère et son induction par la cytokine anti-proliférative TGF- β démontre que cette protéine agit en tant qu'inhibiteur universel de l'activité des Cdks (Datto et al., 1995; Sherr et Roberts, 1995). Cependant, un paradoxe existe entre la présence de cet inhibiteur et l'activité kinase des Cdks de la phase G₁. En effet, p21^{Cip1} est présent dans les complexes Cdks-cyclines actifs (Zhang et al., 1993; Zhang et al., 1994; LaBaer et al., 1997). De plus, plusieurs données dans la littérature démontrent que l'induction de p21^{Cip1} est associé avec la progression des cellules dans le cycle (Nourse et al., 1994; Zhang et al., 1994; Harper et al., 1995; Macleod et al., 1995; Liu et al., 1996). Plus particulièrement, une étude a récemment démontré une induction massive de p21^{Cip1} dans une lignée myéloïde lorsque cette dernière était exposée aux facteurs de croissance "Steel factor" et le GM-CSF. Dans cette étude, l'induction de p21^{Cip1} suivait également l'hyperphosphorylation de pRb (voir plus haut et Mantel et al., 1996). Or toutes ces évidences ont poussé quelques équipes à proposer le modèle suivant: la conversion d'un complexe actif en un complexe inactif est induite par un changement de ratio entre p21^{Cip1} et le complexe Cdk-cycline. Un complexe actif contient une molécule de p21^{Cip1} qui ne peut inhiber l'activité enzymatique du complexe mais pourrait servir de facteur d'assemblage entre les cyclines et les Cdks *in vivo* (p27^{Kip1} aurait également cette propriété d'assembler les complexes *in vivo* et des évidences suggèrent un rôle identique pour p57^{Kip2} *in vitro*) alors que deux molécules ou plus de p21^{Cip1} inhibent l'activité enzymatique des complexes (Zhang et al., 1994; Sherr et Roberts, 1995; LaBaer et al., 1997). En plus d'être impliqué dans l'assemblage des complexes Cdks-cycline, p21^{Cip1}, de même que p27^{Kip1} et p57^{Kip2} (voir plus bas) pourrait également servir à la translocation nucléaire des complexes

Cdk4-cyclines D, là où se retrouve le substrat des Cdks, pRb (LaBaer et al., 1997). Cette propriété importante d'induire la formation des complexes et qui semble partagée par les trois membres de la famille Cip/Kip (ces protéines contiennent effectivement des domaines conservés dans leur partie amino-terminale et impliqués dans la liaison des cyclines et des Cdks), se reflète également chez des souris transgéniques nulles au locus du gène de p21^{Cip1}. En effet, ces dernières ont une croissance normale (Deng et al., 1995) suggérant ainsi que p27^{Kip1} ou p57^{Kip2} ont remplacé la perte de p21^{Cip1} autant pour la régulation négative des complexes (perte d'activité kinase) que la régulation positive (facteur d'assemblage et de translocation nucléaire). Cependant, il est important de noter une diminution significative d'un arrêt en phase G₁ suivant une irradiation- γ chez des fibroblastes isolés à partir d'embryons p21^{Cip1} -/- (MEFs) indiquant un rôle important mais insuffisant de p21^{Cip1} pour le point de surveillance (check point) de l'intégrité du matériel génétique en phase G₁ (Deng et al., 1995).

4.2.3.2.2 p27^{Kip1}

p27^{Kip1} a tout d'abord été identifié comme un inhibiteur de Cdk2 dont l'activité inhibitrice augmentait dans les cellules épithéliales traitées au TGF- β (Slingerland et al., 1994; Polyak et al., 1994b). Plusieurs autres études ont démontré par la suite que l'expression de p27^{Kip1} était augmentée dans les cellules quiescentes (en G₀), les cellules arrêtées en G₁ par inhibition de contact ou perte d'attachement à une matrice et dans les cellules exposées à des signaux anti-prolifératifs comme le TGF- β , la rapamycine et l'AMPc (Nourse et al., 1994; Slingerland et al., 1994; Kato et al., 1994b; Polyak et al., 1994b). À l'inverse, le niveau d'expression de p27^{Kip1} diminuait fortement lorsque des mitogènes induisent une réentrée des cellules cibles dans le cycle (Nourse et al., 1994; Kato et al., 1994b; Coats et al., 1996; Winston et al., 1996a; Shankland et al., 1997; Yang et al., 1998) et voir aussi la section résultats. Cette diminution d'expression serait due essentiellement à deux mécanismes: 1) une augmentation de la dégradation (diminution du temps de demi-vie) de p27^{Kip1} suite à sa phosphorylation par les complexes Cdk2-cycline E et son ciblage vers la voie ubiquitine-protéasome (Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997) et 2) une diminution de la synthèse de p27^{Kip1} (Agrawal et al., 1996; Hengst et Reed, 1996; et voir aussi chapitre II). En plus d'une diminution de l'expression de p27^{Kip1} par les mitogènes, d'autres mécanismes influençant la disponibilité de cet inhibiteur ont été caractérisés. De ceux-ci, on retient la séquestration non-covalente de p27^{Kip1} par des mécanismes de titration mettant en jeu les complexes Cdk4-cyclines D (voir plus haut et Sherr et

Roberts, 1995). Finalement, l'expression ectopique de p27^{Kip1} provoque l'arrêt des cellules en phase G₁ (Toyoshima et Hunter, 1994; Polyak et al., 1994a) et l'inhibition antisens de l'expression de p27^{Kip1} empêche l'état de quiescence dans des fibroblastes (Coats et al., 1996; Rivard et al., 1996). Ces résultats et plusieurs autres études *in vitro* confirment maintenant un rôle essentiel de p27^{Kip1} dans l'établissement d'un état de quiescence et le contrôle de la transition G₁-S des cellules. En ce qui à trait au contrôle de la transition G₁-S, plusieurs évidences suggèrent qu'en plus d'être un inhibiteur, p27^{Kip1}, comme pour ce qui est de p21^{Cip1}, se retrouve dans les complexes Cdk-cyclines catalytiquement actifs (voir section sur les protéines Ink4) et (Florenes et al., 1996; Soos et al., 1996) suggérant ainsi un rôle de p27^{Kip1} dans la formation des complexes (LaBaer et al., 1997). Alors quelles sont les paramètres cellulaires contrôlant la destinée p27^{Kip1} et p21^{Cip1}; inhibiteurs où facteurs d'assemblage? Il semble que cette dernière soit la résultante d'un paramètre bien précis: la sensibilité des complexes Cdk-cyclines aux concentrations environnantes de p21^{Cip1} et p27^{Kip1}. En effet, l'observation que les complexes Cdk4-cycline D peuvent servir de réservoir de p27^{Kip1} démontre que ces complexes sont peu sensibles, comparativement aux complexes Cdk2-cycline A/E par exemple, aux effets inhibiteur de ce CKI (Toyoshima et Hunter, 1994; Polyak et al., 1994a; Harper et al., 1995) et voir la section sur les protéines Ink4. De plus, comme il sera discuté dans la section 4.2.4, certaines conditions expérimentales *in vitro* augmentent de façon importante l'expression de ces CKIs, et sous ces conditions ces derniers n'agissent plus en tant que facteurs d'assemblage mais inhibent fortement l'activité kinase des complexes Cdk-cyclines (changement de ratio entre les CKIs et les complexes Cdk-cyclines, voir paragraphe précédent). Malgré ces évidences *in vitro*, le rôle principale de p27^{Kip1} *in vivo* semble se concentrer au niveau de l'inhibition de l'activité des complexes Cdk-cyclines. Effectivement, les scientifiques observent une croissance exagérée de plusieurs organes, et le développement de tumeurs de l'hypophyse chez des souris transgéniques nulles au locus du gène de p27^{Kip1} (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996), démontrant ainsi une implication importante de cette protéine dans la régulation de la croissance cellulaire chez l'animal. Ces résultats suggèrent de plus que des procédés autres que des mutations génétiques, comme des anomalies au niveau post-traductionnel (la phosphorylation de p27^{Kip1} par exemple), peuvent être reliées au développement de tumeurs et/ou la croissance exagérée des organes (Dahia et al., 1998). Ils suggèrent également que si la famille Cip/Kip est bien impliquée dans la formation des complexes *in vivo*, or dans ce modèle de souris p27^{Kip1} *-/-*, les fonctions

de facteur d'assemblage de p27^{Kip1} sont possiblement complémentées par la présence de p21^{Cip1}, p57^{Kip2} ou un autre facteur d'assemblage non-caractérisé à ce jour.

4.2.3.2.3 p57^{Kip2}

Bien que p57^{Kip2} se lie aux complexes Cdks-cyclines *in vitro* et *in vivo* inhibant l'activité kinase de ces complexes (Sherr et Roberts, 1995), ce dernier se distingue de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} de part sa structure et sa distribution (Lee et al., 1995). p57^{Kip2} est constitué d'un domain homologue à p21^{Cip1} et p27^{Kip1} dans sa partie amino-terminale et est suivie de domaines uniques riches en résidus proline (28%) et en acides (36% d'acides glutamique ou aspartique), et un domaine carboxy-terminal partageant certaines similitudes avec p27^{Kip1} (Lee et al., 1995). Contrairement aux ubiquistes p21^{Cip1} et p27^{Kip1}, l'expression de p57^{Kip2} est restreinte à quelques tissus. Ainsi l'ARNm du gène *Kip2* est retrouvé en grande quantité dans le placenta et en plus petite quantité dans les muscles squelettiques, le coeur, le rein, le poumon, le pancréas et le cerveau (Lee et al., 1995; Sherr et Roberts, 1995). L'expression de p57^{Kip2} semble donc importante au niveau des cellules différenciées de façon terminale indiquant un rôle possiblement fort important de cette protéine dans les procédés de croissance et de différenciation qui ont lieu lors du développement. Deux récentes études utilisant des souris transgéniques nulles au locus du gène *Kip2* appuient cette affirmation (Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997). Ces souris présentent un développement incomplet du système gastro-intestinal, des défauts importants au niveau de la musculature abdominale, des anomalies au niveau de l'ossification endochondrale causés par un retard dans la sortie du cycle cellulaire lors de la différenciation des chondrocytes, une hyperplasie du cortex surrénalien et une hyperprolifération des cellules de la corné. Plusieurs de ces phénotypes sont rencontrés chez des patients souffrant du symptôme de Beckwith-Wiedemann, un désordre héréditaire caractérisé par une surcroissance des tissus et une prédisposition au cancer. Ces résultats démontrent également que p21^{Cip1} et p27^{Kip1} ne peuvent compenser la perte p57^{Kip2}.

4.2.4 La voie MAP kinase ERK et le cycle cellulaire

La transition de cellules quiescentes vers la phase G₁ et la progression de ces dernières vers la phase S requièrent l'intégration des signaux extracellulaires vers la machinerie du cycle cellulaire. Trois voies majeures de signalisation semblent participer

dans l'intégration de ces signaux: 1) l'assemblage et l'activation des complexes Cdk4-cyclines D, 2) l'activation de la cascade Ras/Raf/Mek/ERK et 3) la baisse d'expression de p27^{Kip1}. Effectivement, les complexes Cdk4-cycline D phosphorylent pRb, permettant la relâche de facteur de transcription important pour l'entrer en phase S (voir paragraphes précédents). Comme il a été mentionné plus haut, ces complexes sont aussi important dans la titration de certain CKI, comme p27^{Kip1}. En accord avec ces résultats, la microinjection des complexes Cdk4-cycline D1, préparé à partir de cellules d'insectes, est suffisante pour initier la synthèse d'ADN dans un modèle de fibroblaste humain en état de quiescence (Connell-Crowley et al., 1998). En ce qui à trait aux voies de signalisation dépendantes de Ras, des mutations dans cette protéine (Ras constitutivement actif) sont retrouvées dans une multitude de cancer indiquant un lien possible entre cette intégrateur de plusieurs signaux membranaires et les effecteurs du cycle cellulaire. *In vitro*, la microinjection de la protéine Ras activée ou normale est suffisante pour induire la progression de la phase G₀ vers la phase S, et cela en absence de sérum (Feramisco et al., 1984; Stacey et Kung, 1984). La protéine Ras intègre les signaux extracellulaires en activant plusieurs voies de signalisation dont le module Raf/Mek/ERK est le mieux caractérisé (voir section sur les MAP kinases). Ainsi, chaque élément de ce module semble participer de façon importante dans la progression en phase G₁ (Kolch et al., 1991; Pages et al., 1993; Brunet et al., 1994; Cowley et al., 1994; Meloche, 1995). La baisse d'expression de p27^{Kip1} est également une cible qu'emprunte les facteurs mitogéniques afin d'induire une entrée en phase S des cellules (voir chapitre II et références cités dans la section sur p27^{Kip1}). Un fait important, ces trois voies de signalisation participant à l'intégration des signaux extracellulaires (l'assemblage et l'activation des complexes Cdk4-cyclines D, l'activation de la cascade Ras/Raf/Mek/ERK et la baisse d'expression de p27^{Kip1}) sont en partie liées. Effectivement, il a été démontré que l'expression de cycline D1 (cofacteur essentiel de Cdk4) et de p21^{Cip1} (rôle possible de facteur d'assemblage et CKI) est modulée positivement par la cascade Ras/Raf/Mek/Erk alors que cette dernière (du moins Ras) participe également à la baisse d'expression de p27^{Kip1} (Lavoie et al., 1996; Liu et al., 1996; Winston et al., 1996b; Aktas et al., 1997; Kawada et al., 1997; Pumiglia et Decker, 1997; Sewing et al., 1997; Weber et al., 1997a; Weber et al., 1997b; Woods et al., 1997; Cheng et al., 1998). Ces études indiquent de plus qu'une stimulation soutenue de la cascade Ras/Raf/Mek/Erk est essentielle afin d'induire une expression importante de la cycline D1 et sa liaison avec Cdk4 mais également qu'une activation soutenue de Ras est essentielle dans la baisse d'expression de p27^{Kip1} en fin de phase G₁. Cette baisse d'expresssion "Ras dépendante" de p27^{kip1} par les mitogènes ne

semble pas utiliser le module Raf/Mek/Erk mais plutôt un autre effecteur de Ras, la protéine G monomérique RhoA (Hirai et al., 1997; Weber et al., 1997a). L'implication de cette cascade dans la transition G₁-S est cependant en apparence contradiction avec le rôle de Ras et Raf/Mek/ERK dans les processus de différenciation cellulaire et donc d'arrêt de cellules en phase G₁ (Ridley et al., 1988; Heasley et Johnson, 1992; Traverse et al., 1992; Lloyd et al., 1997; Pumiglia et Decker, 1997). Des études récentes ont cependant démontré que non seulement la durée d'activation de ce module décide d'une transition vers la phase S mais également son intensité. Ainsi, une stimulation moyenne mais soutenue de Raf induit l'activation des complexes Cdk4-cycline D1 et Cdk2-cycline E conduisant à la synthèse D'ADN alors qu'une stimulation importante de Raf, bien qu'augmentant l'expression de la cycline D1, induit également une expression très importante de p21^{Cip1} causant ainsi une inhibition de l'activité kinase des complexes Cdk4-cycline D1 et Cdk2-cycline E et l'arrêt des cellules en phase G₁ (Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997).

5.0 Objectifs de la présente étude

1) Plusieurs études ont déjà démontré un rôle incontournable des MAP kinases ERKs dans le contrôle de la croissance cellulaire. Peu d'études ont cependant adressé spécifiquement le rôle de ces kinases dans l'effet hypertrophique de l'Ang II dans les CMLV. Grâce au développement d'un inhibiteur spécifique de l'activation de MEK, le PD98059, nous avons pu disposer d'un outil pharmacologique afin de répondre à cette question. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article dont je suis le premier auteur.

2) L'AMPc est un second messager impliqué dans le contrôle de la croissance de plusieurs types cellulaires. En effet, selon l'origine de la cellule et son stade de différenciation, l'AMPc inhibe ou bien stimule la croissance cellulaire. Notre objectif était donc de vérifier, dans un premier temps, l'impact d'une élévation intracellulaire d'AMPc, par l'utilisation de l'IBMX et de la forskoline, sur les effets hypertrophiques de l'Ang II dans les CMLV. Dans un deuxième temps, nous proposons également l'étude des événements moléculaires impliqués dans les effets inhibiteurs ou stimulateurs d'une élévation en AMPc sur les propriétés hypertrophiantes de l'Ang II. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article dont je suis coauteur.

3) Les paragraphes précédents ont démontré que l'Ang II est responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation, induisant ainsi l'hypertrophie des CMLV sans phénomène hyperplasique (division cellulaire). Un fait remarquable cependant est que le PDGF-BB, un mitogène puissant pour ces cellules, active des voies de signalisation similaires à celles stimulées par l'Ang II. Nous avons donc proposé l'hypothèse suivante: l'Ang II n'induisant aucune synthèse d'ADN dans les CMLV, il est fort probable que ce peptide module de façon différente certains effecteurs du cycle cellulaire comparativement au PDGF-BB. Nous avons ainsi entrepris l'étude de l'action de ces deux facteurs de croissance sur les effecteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article dont je suis le premier auteur.

4) Comme mentionné auparavant, la quasi totalité des effets physiologiques de l'Ang II sont relayés par le récepteur AT_1 . Ainsi, dans les CMLV de rat en culture, les récepteurs AT_1 sont couplés positivement à la PLC et négativement à l'adénylyl cyclase par l'intermédiaire des protéines G. Ces enzymes agissent sur des substrats spécifiques pour générer des seconds messagers qui ont la capacité de transformer un signal extracellulaire en une série complexe d'événements biochimiques intracellulaires dont l'hypertrophie cellulaire en est la résultante. Malgré ces données relatives à l'existence d'une signalisation précoce importante dans les CMLV, le rôle précis de ces seconds messagers dans l'effet hypertrophique de l'Ang II reste à préciser et plusieurs questions sont encore sans réponses. Quels sont les rôles des voies α_i et α_q et des dimères $\beta\gamma$? Est-ce que l'activation de la PLC et l'inhibition de l'adénylyl cyclase sont essentielles aux effets trophiques de l'hormone? Est-ce que l'Ang II active d'autres voies précoces non caractérisées pour l'instant mais essentielles à son action hypertrophique? De plus, qu'en est-il du récepteur AT_1 humain? Ce dernier a-t-il la capacité d'induire l'hypertrophie cellulaire comme son homologue chez les rongeurs? Par la création d'une lignée cellulaire exprimant de façon stable le récepteur AT_1 humain, nous avons répondu en partie à ces questions. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article dont je suis coauteur.

CHAPITRE II

RÉSULTATS

Résumé d'article

Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells

par

Marc J. Servant, Edith Giasson et Sylvain Meloche

L'Ang II est une hormone peptidique impliquée dans la régulation de la pression artérielle et de la balance électrolytique. Ce peptide joue également un rôle important dans la pathogénèse de certaines maladies cardiovasculaires. En plus de ces effets physiologiques classiques, des études récentes ont démontré que l'Ang II exerce un effet trophique (hypertrophie cellulaire) sur les CMLV. Cependant, très peu de données existent sur les mécanismes de transduction de cette réponse hypertrophique dans les CMLV ou autres types cellulaires. L'objectif principal de ce projet est de caractériser les voies de signalisation responsables de cette réponse hypertrophique. Plusieurs évidences expérimentales suggèrent fortement un rôle de la voie MAP kinase ERK dans les processus complexes de croissance cellulaire. De plus, une réponse commune à toutes les cellules face aux facteurs de croissance est une augmentation importante de la synthèse protéique. À la lumière de ces résultats, nous avons utilisé un inhibiteur de MEK, le PD 98059, afin de déterminer le rôle de la voie MAP kinase dans la régulation de la synthèse de protéines par l'Ang II. Un prétraitement des CMLV avec le PD 98059 a complètement inhibé l'effet stimulateur de l'Ang II sur la phosphorylation et l'activation des isoformes de MEK et ainsi donc des isoformes de ERK. Cette inhibition par le PD 98059 s'est avérée spécifique pour la voie MAP kinase puisque la stimulation, par l'Ang II, de la phospholipase C, de la p70^{S6k} ou de la phosphorylation en tyrosine n'ont pas été affecté par un prétraitement au PD 98059. Un fait remarquable cependant, le traitement des CMLV avec le PD 98059 a potentiellement inhibé la synthèse protéique induite par l'Ang II avec un IC₅₀ de 4.3 µM. D'autres facteurs de croissance, passant soient par des récepteurs tyrosines kinases, ou couplés aux protéines G, on vu également leur efficacité diminuer partiellement en présence du PD 98059. Ces résultats indiquent clairement que la voie MAP kinase ERK est impliquée dans les processus de régulation de la synthèse protéique induite par des facteurs de croissance comme l'Ang II, dans les CMLV.

Inhibition of Growth Factor-induced Protein Synthesis by a Selective MEK Inhibitor in Aortic Smooth Muscle Cells*

(Received for publication, October 19, 1995, and in revised form, March 5, 1996)

Marc J. Servant[‡], Edith Giasson, and Sylvain Meloche[§]

From the Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal and Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, H2W 1T8 Canada

A common response of cells to mitogenic and hypertrophic factors is the activation of high rates of protein synthesis. To investigate the molecular basis of this action, we have used the recently developed MAP kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK) inhibitor PD 98059 to examine the involvement of the ERK pathway in the regulation of global protein synthesis by growth factors in rat aortic smooth muscle cells (SMC). Incubation with PD 98059 blocked angiotensin II (AII)-dependent phosphorylation and enzymatic activity of both MEK1 and MEK2 isoforms, leading to inhibition of the phosphorylation and activation of p44^{mapk} and p42^{mapk}. The compound was found to selectively inhibit activation of the ERK pathway by AII, but not the stimulation of p70 S6 kinase, phospholipase C, or tyrosine phosphorylation. Most importantly, treatment of aortic SMC with PD 98059 potently inhibited AII-stimulated protein synthesis with a half-maximal inhibitory concentration of 4.3 μ M. The effect of PD 98059 was not restricted to AII, since the compound also blocked to various extent the induction of protein synthesis by growth factors acting through tyrosine kinase receptors, G protein-coupled receptors, or protein kinase C. These results provide strong evidence that activation of ERK isoforms is an obligatory step for growth factor-induced protein synthesis in aortic SMC.

One of the early obligatory responses elicited by mitogenic and hypertrophic factors is the stimulation of protein synthesis which results from changes at both the transcriptional and translational levels (1-3). Although the signaling mechanisms involved in this response remain poorly defined, it is known that phosphorylation/dephosphorylation reactions play a critical role in controlling the overall rate of protein synthesis (1, 4, 5). Signals initiated by growth factors interacting with receptor tyrosine kinases or G protein-coupled receptors are integrated and propagated through an elaborated network of cytoplasmic serine/threonine kinases (6-8). The best understood of these protein kinase cascades is the mitogen-activated protein (MAP)¹ kinase module leading to activation of the ERK sub-

family of MAP kinases (9-12). Two isoforms of ERKs, referred to as p44^{mapk} (ERK1) and p42^{mapk} (ERK2), have been described and found ubiquitously expressed in tissues (13, 14). ERK isoforms are activated by phosphorylation on both threonine and tyrosine residues by two dual-specificity MAP kinase kinases termed MEK1 and MEK2 (9, 12, 15, 16). MEKs are in turn activated by serine phosphorylation catalyzed by a number of MAP kinase kinase kinases which include Raf-1 (17-20), B-Raf (21-24), Mos (25), and MEK kinase-1 (26).

While the mechanisms of ERKs regulation are relatively well understood, the precise physiological roles of these enzymes remain to be established. The p44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms are rapidly phosphorylated and activated in response to virtually all growth factors (14, 27). However, the observation that a MAP kinase is activated in a specific process does not demonstrate that this enzyme is functionally essential *in vivo*. Strong evidence for the critical involvement of ERKs in the regulation of cell proliferation were obtained from studies showing a close correlation between ERKs activation and DNA synthesis (28, 29) and from the demonstration that inhibition of cellular ERKs activity blocks cell cycle progression (30, 31). Studies using constitutively active and dominant-negative mutants of MEK1 or thiophosphorylated MAP kinase (32, 33), together with pharmacological blockade experiments (34), also demonstrated the absolute requirement of the ERK pathway for neuronal differentiation. The role of the ERK pathway in the regulation of protein synthesis and in many other growth-related processes remains to be clarified.

The peptide hormone AII provides a good model system to study the signaling pathways by which growth factors regulate the rate of protein synthesis. In vascular SMC, AII induces cellular hypertrophy as a result of increased protein synthesis, but has no effect on cell division (35-38). The trophic action of AII is initiated by its interaction with the G protein-coupled AT₁ receptor, which stimulates the activity of phospholipase C to produce the second messengers IP₃ and diacylglycerol, and inhibits the activity of adenylyl cyclase (39, 40). These early signals ultimately result in the activation of ERKs (38, 41, 42) and of the 70/85-kDa S6 protein kinases (38).

The aim of this study was to evaluate the involvement of the ERK pathway in the stimulatory effect of growth factors on protein synthesis in vascular SMC. To this end, we used a selective inhibitor of this pathway, PD 98059, which has been shown to inhibit MEK activity in PC-12 (34) and Swiss 3T3 cells (43). We show that PD 98059 blocks AII-induced phosphorylation and activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} in rat aortic SMC. Most importantly, we demonstrate that the drug inhibitor prevents the increased rate of protein synthesis by AII and

* This work was supported in part by grants from the National Cancer Institute of Canada and 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 Heart and Stroke Foundation of Canada studentship.

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

¹ The abbreviations used are: MAP, mitogen-activated protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEK, MAP kinase/ERK kinase; AII, angiotensin II; SMC, smooth muscle cells; IP₃, inositol 1,4,5-

trisphosphate; MBP, myelin basic protein; mAb, monoclonal antibody; p70^{S6K}, p70 S6 kinase; 4E-BP1, 4E-binding protein 1; eIF, eukaryotic initiation factor; GSK3, glycogen synthase kinase-3; p90^{rsk}, p90 ribosomal S6 kinase.

other growth factors acting through distinct types of receptors. These results provide the first direct evidence that the ERK pathway plays a critical role in the regulation of global protein synthesis in mammalian cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—AII was purchased from Hukabel Scientific. [^3H]IP₃, [γ - ^{32}P]ATP, [^{32}P]phosphoric acid, and [^3H]leucine were from Amersham Corp. Protein A-Sepharose was obtained from Pharmacia Biotech Inc. Protease inhibitors and bovine MBP were from Sigma. IP₃ and phorbol 12-myristate 13-acetate were from LC Services. PD 98059 was a gift of Parke-Davis Pharmaceutical Research Division and was dissolved in dimethyl sulfoxide at a concentration of 30 mM. Rapamycin was a gift of Wyeth-Ayerst Research. The p70^{SEK} antiserum was generously provided by Dr. Frederick Hall (Children's Hospital of Los Angeles). Antiserum SM1 has been described previously and specifically immunoprecipitates p44^{mapk} protein (44). The antipeptide serum α Icp42 was kindly provided by Drs. Yizheng Wang and Michael Dunn (Case Western Reserve University) and specifically recognizes the native p42^{mapk} isoform (44, 45). The anti-MAPKK serum was provided by Drs. Gilles L'Allemain and Jacques Pouyssegur (Université de Nice). This polyclonal antibody specifically immunoprecipitates the MEK1 isoform of MAP kinase kinases. The anti-MEK2 monoclonal antibody was purchased from Transduction Laboratories and specifically immunoprecipitates the MEK2 isoform. Anti-phosphotyrosine mAbs 4G10 and PY-20 were purchased from Upstate Biotechnology and ICN, respectively.

Cell Culture—Rat aortic SMC were cultured and synchronized in the quiescent state as described previously (38). For experiments with PD 98059 and rapamycin, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated concentrations of agents for 30 min before addition of growth factors.

Protein Kinase Assays—Quiescent aortic SMC were stimulated with 100 nM AII for 5 (ERK assays), 3 (MEK assays), or 15 min (p70^{SEK} assays). The enzymatic activity of ERK isoforms was measured by a specific immune complex kinase assay using MBP as substrate as described (38, 44). The phosphotransferase activity of p70^{SEK} was measured by an immune complex kinase assay using the S6 peptide RRRLSSLRA (Upstate Biotechnology) as substrate (38). The enzymatic activity of MEK1 and MEK2 was assayed by measuring their ability to increase the MBP kinase activity of recombinant p44^{mapk} *in vitro*. Details of the procedure will be described elsewhere.² Briefly, cell lysates were prepared as described (38) and 100 μg (MEK1 assays) or 600 μg (MEK2 assays) of lysate proteins were incubated for 4 h at 4 °C with 1 μl of anti-MAPKK serum or 4 μl of anti-MEK2 mAb preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immune complexes were washed 3 times with lysis buffer, once with kinase assay buffer (20 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.4), and then resuspended in kinase assay buffer containing 50 μM ATP, 5 μCi of [γ - ^{32}P]ATP, and 300 ng of recombinant p44^{mapk}. After incubation at 30 °C for 30 min, bovine MBP (0.25 mg/ml) was added and the incubation was continued for an additional 10 min. The reaction was stopped by addition of 2 \times Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels and the band corresponding to MBP was excised and counted in a liquid scintillation counter.

^{32}P 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 Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.75 mCi/ml [^{32}P]phosphoric acid. The cells were then stimulated by addition of 100 nM AII to the medium for 5 min and quickly washed with ice-cold phosphate-buffered saline. Cell lysates were prepared as described above. The lysates were then pre-cleared for 1 h with 10 μl of normal rabbit serum and incubated for 4 h at 4 °C with either 10 μl of SM1 antiserum, 3 μl of α Icp42 antiserum, 4 μl of MAPKK antiserum, or 10 μl of anti-MEK2 mAb preadsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complexes were washed six times with lysis buffer. Protein complexes were eluted by heating at 95 °C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels.

Measurement of IP₃—The intracellular mass of IP₃ was measured by a specific radioreceptor assay (46). Quiescent aortic SMC in 35-mm Petri dishes were stimulated with AII for 15 s at 37 °C. The incubation was terminated by addition of 100 μl of cold 40% trichloroacetic acid

(final concentration of 10%). After extraction for 10–20 min on ice, the cells were scraped and centrifuged at 13,000 $\times g$ for 5 min at 4 °C. The resulting supernatant was extracted five times with 2 ml of water-saturated diethyl ether and neutralized with 30 μl of 1 M NaHCO₃ (pH 8.5). An aliquot of 100 μl of cell extract was then assayed for IP₃ mass. For IP₃ binding assays, 750 μg of adrenocortical membranes (46) were incubated with 1 nM [^3H]IP₃ and an aliquot of cell extract or varying concentrations of unlabeled IP₃ for 30 min at 4 °C in a total volume of 500 μl of IP₃ binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 20 mM NaCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin). Bound [^3H]IP₃ was separated from free ligand by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed by aspiration and the radioactivity in the pellet was determined by liquid scintillation counting. Averages of duplicate determinations of bound [^3H]IP₃ were used for data analysis. The mass of IP₃ is expressed as picomoles of IP₃ produced per mg of protein.

Anti-phosphotyrosine Immunoblot Analysis—Quiescent aortic SMC in 100-mm Petri dishes were washed once and stimulated with 100 nM AII at 37 °C for 5 min. The cells were then washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 0.8 ml of Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10⁻⁴ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A, 1% Triton X-100) for 20 min at 4 °C. Lysates were clarified by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 10 min and equal amounts of lysate proteins (100 μg) were subjected to immunoprecipitation with 20 μl of agarose-coupled PY-20 mAb for 2 h at 4 °C. Immune complexes were washed three times with lysis buffer prior to electrophoresis on 7.5% acrylamide gels. After electrophoresis, proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine. Membranes were blocked in Tris-buffered saline containing 5% non-fat dry milk for 1 h at 37 °C prior to incubation for 1 h at 25 °C with mAb 4G10 (1:5,000) in blocking solution. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham).

Protein Synthesis Measurements—Quiescent aortic SMC in triplicate wells of 24-well plates were stimulated with the indicated concentrations of growth factors in serum-free quiescence medium containing 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]leucine. After 24 h of stimulation, the medium was aspirated and the cells were incubated for a minimum of 30 min in cold 5% trichloroacetic acid. The wells were then washed once with trichloroacetic acid and three times with tap water. The radioactivity incorporated into trichloroacetic acid-precipitable material was measured by liquid scintillation counting after solubilization in 0.1 M NaOH. For experiments with drug inhibitors, quiescent cells were pretreated for 30 min with the indicated concentrations of agents and stimulated for 24 h in the continuous presence of the inhibitor.

Other Methods—Protein concentrations were measured using the BCA protein assay kit (Pierce) with bovine serum albumin as standard. Dose-response curves were analyzed according to a four-parameter logistic equation using the ALLFIT computer program (47).

RESULTS

PD 98059 is a synthetic drug inhibitor that selectively blocks the activity of the ERK pathway at the level of MEK (34, 43, 48). To explore the role of the ERK pathway in the hypertrophic action of AII, we first examined the effect of PD 98059 on AII-dependent phosphorylation and activation of MEK and ERK isoforms in rat aortic SMC. Growth-arrested cells were labeled with $^{32}\text{P}_i$, stimulated with AII for 5 min, and MEK1, MEK2, p44^{mapk}, and p42^{mapk} were immunoprecipitated from cell lysates prior to analysis by gel electrophoresis. Little phosphorylation of MEK1 and MEK2 was detected in resting cells and treatment with AII significantly increased the phosphate content of the two proteins (Fig. 1A). Pretreatment of the cells with PD 98059 completely suppressed the phosphorylation of MEK1 and MEK2, thereby suggesting that the inhibitor interferes with the upstream activation of these enzymes. In parallel to these experiments, extracts from similarly-treated cells were used to test the enzymatic activity of MEKs in a reconstitution assay using recombinant p44^{mapk} and MBP as substrate. Addition of AII to quiescent SMC caused a 9-fold increase in both MEK1 and MEK2 activity, which was inhibited approximately 80% by preincubation of the cells with 30 μM PD

² E. Giasson, K. Gopalbhai, and S. Meloche, manuscript in preparation.

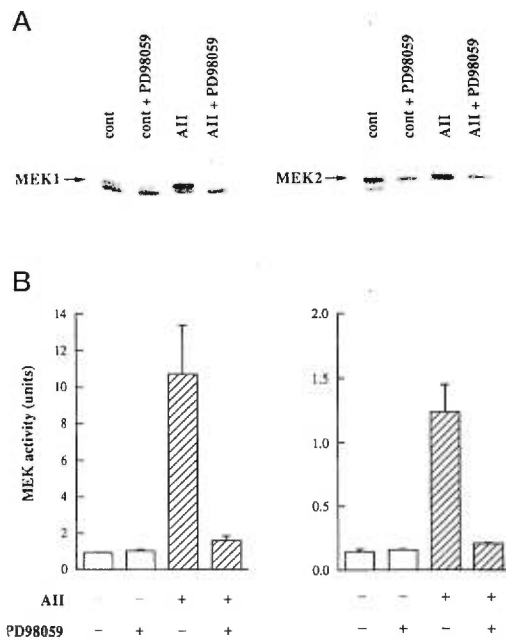


FIG. 1. PD 98059 inhibits AII-induced phosphorylation and enzymatic activation of MEK isoforms in rat aortic SMC. *A*, phosphorylation of MEK isoforms. Quiescent rat aortic SMC were labeled with [32 P]phosphoric acid for 5 h. The cells were then treated with vehicle alone or with 30 μ M PD 98059 for 30 min prior to stimulation with 100 nM AII for 5 min. The cells were lysed, and MEK1 (*left panel*) or MEK2 (*right panel*) were immunoprecipitated using specific antibodies preadsorbed to protein A-Sepharose beads as described under "Experimental Procedures." The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels and analyzed by autoradiography. *B*, enzymatic activity of MEK isoforms. Quiescent rat aortic SMC were pretreated as described above. The cells were then stimulated or not with 100 nM AII for 3 min. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation as above. The immune complexes were washed and enzymatic activity was measured in a reconstitution assay using recombinant p44^{mapk} and MBP as substrate. The enzymatic activities are expressed in units, where 1 unit corresponds to 1 pmol of phosphate incorporated into MBP per min per mg of lysate protein. Results represent the mean \pm S.E. of duplicate determinations.

98059 (Fig. 1B). These results confirm that the compound exerts inhibitory effects on both isoforms of MEK in intact cells. As previously reported (38, 41, 42), AII strongly stimulated the phosphorylation and enzymatic activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms in quiescent aortic SMC. Pretreatment of cells with PD 98059 prevented the phosphorylation of the two enzymes and, as a consequence, blocked their activation by the growth factor (Fig. 2). Thus, these results confirm that PD 98059 is a valuable tool to inhibit the cellular activity of the ERK pathway in rat aortic SMC.

To demonstrate that PD 98059 selectively blocks the activation of ERKs, we then examined the effects of the compound on AII-stimulated IP₃ production, p70^{S6K} activity, and tyrosine phosphorylation in rat aortic SMC. AII binding to the AT₁ receptor rapidly stimulates the activity of phospholipase C in vascular SMC, leading to the formation of IP₃ (39, 40, 49). As shown in Fig. 3A, pretreatment of quiescent aortic SMC with 30 μ M PD 98059 did not prevent the rapid increase in the production of IP₃ induced by AII. We have previously demonstrated that AII potently stimulates the phosphotransferase activity of p70^{S6K} in aortic SMC (38). To determine if PD 98059 interferes with p70^{S6K} activation, cells were treated with the MEK inhibitor prior to AII stimulation and the activity of p70^{S6K} was measured by immune complex kinase assay. Fig.

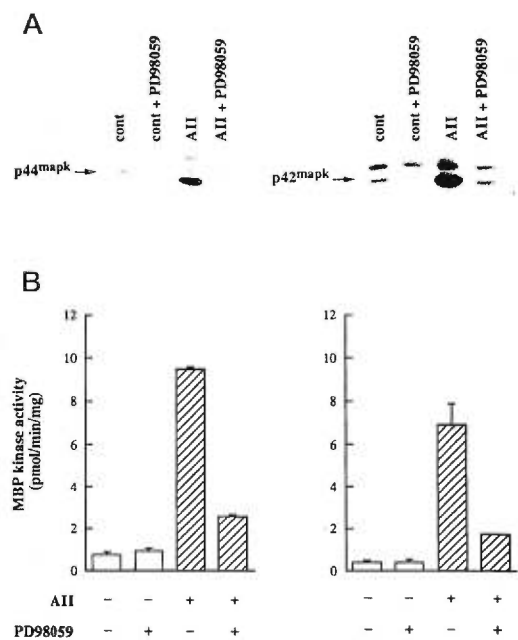


FIG. 2. PD 98059 inhibits AII-induced phosphorylation and enzymatic activation of ERK isoforms in rat aortic SMC. *A*, phosphorylation of ERK isoforms. The phosphorylation of ERK isoforms was analyzed as described in the legend to Fig. 1A using antibodies specific to each ERK isoform (see "Experimental Procedures"). *B*, enzymatic activity of ERK isoforms. Quiescent rat aortic SMC were treated with vehicle alone or with 30 μ M PD 98059 for 30 min. The cells were then stimulated or not with 100 nM AII for 5 min. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation as above using specific antibodies to ERK isoforms. The immune complexes were washed and phosphotransferase activity was assayed using MBP 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.

3B shows that treatment with 30 μ M PD 98059 had no effect on AII-dependent activation of p70^{S6K} in aortic SMC. Stimulation of vascular SMC with AII also leads to increased tyrosine phosphorylation of several proteins, including two major bands of apparent molecular mass 65–75 and 120 kDa (49–51). The 65–75-kDa band has been recently identified as the focal adhesion-associated protein paxillin, whereas the 120-kDa band may correspond to p125 focal adhesion kinase (52, 53). To further test the selectivity of PD 98059, rat aortic SMC were treated with or without PD 98059, followed by exposure to AII for 5 min. Cells lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with agarose-linked PY-20 antiphosphotyrosine mAb, prior to analysis by immunoblotting with 4G10 antiphosphotyrosine mAb. Fig. 3C shows that PD 98059 did not affect AII-stimulated tyrosine phosphorylation of the M_r 65,000–75,000 and 120,000 protein bands. Together, these results indicate that PD 98059 selectively inhibits the activation of ERK isoforms in intact SMC.

We next examined the effect of PD 98059 on growth factor-stimulated protein synthesis. For these experiments, quiescent rat aortic SMC were preincubated for 30 min with PD 98059 prior to stimulation with growth factors for 24 h in the continuous presence of the drug. PD 98059 was found to potently inhibit AII-induced protein synthesis in these cells, with 70% inhibition observed at a concentration of 30 μ M (Fig. 4A). Half-maximal inhibition was observed in the presence of 4.3 ± 1.6 μ M PD 98059 ($n = 2$), which is similar to the concentration required for 50% inhibition of [3 H]thymidine incorporation in

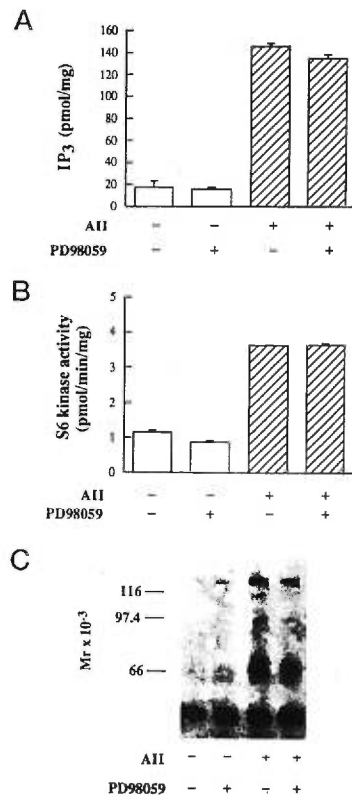


FIG. 3. PD 98059 does not block the stimulatory effect of AII on phospholipase C, p70^{S6K}, or tyrosine phosphorylation in rat aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min with vehicle alone or with 30 μ M PD 98059. The cells were then stimulated or not with 100 nM AII for 15 s (IP₃ production), 15 min (p70^{S6K} assays), or 5 min (tyrosine phosphorylation). **A**, activation of phospholipase C. The intracellular content of IP₃ was measured by a specific radioreceptor assay as described under "Experimental Procedures." Results are expressed as picomoles of IP₃ produced per mg of protein and represent the mean \pm S.E. of duplicate determinations. **B**, activation of p70^{S6K}. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with p70^{S6K} antiserum preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The phosphotransferase activity of p70^{S6K} was assayed directly on the immune complexes using an S6 peptide as substrate. The enzymatic activities are expressed as picomoles of phosphate incorporated into the peptide per min per mg of lysate protein. Each value represent the mean \pm S.E. of duplicate determinations. **C**, tyrosine phosphorylation. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with agarose-coupled antiphosphotyrosine mAb PY-20. Proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 7.5% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membrane prior to analysis by immunoblotting with anti-phosphotyrosine mAb 4G10. Molecular weight standards are shown on the left.

platelet-derived growth factor-stimulated Swiss 3T3 cells (43). To verify the general involvement of the ERK pathway in the regulation of protein synthesis by growth factors, aortic SMC were treated as above and stimulated with different growth factors acting through distinct types of receptors. PD 98059 was found to also inhibit the increased rate of protein synthesis induced by thrombin, insulin, basic fibroblast growth factor, and the protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (Fig. 4B). The extent of inhibition by PD 98059 varied for the different growth factors studied, suggesting that the ERK pathway may be of greater importance to the action of certain agonists in these cells.

We have recently reported that the immunosuppressant drug rapamycin, which selectively blocks p70^{S6K} activation, strongly inhibits AII-stimulated protein synthesis in aortic SMC (38). In view of the above findings, it was of interest to

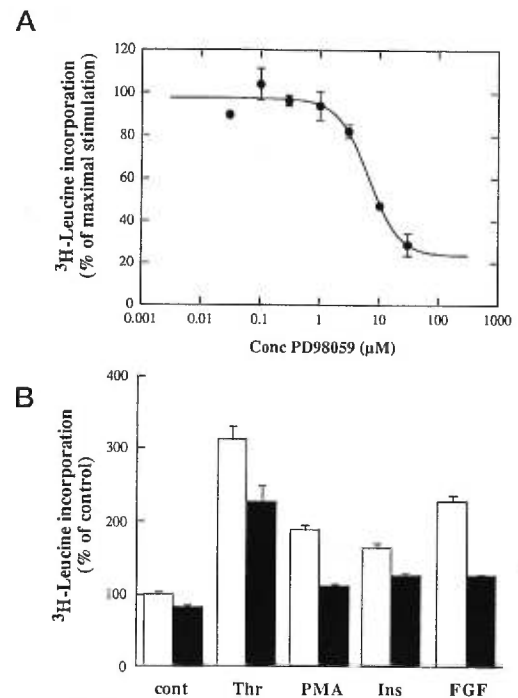


FIG. 4. Inhibition of growth factor-stimulated protein synthesis by PD 98059 in rat aortic SMC. Rat aortic SMC were made quiescent by incubation in serum-free medium for 48 h. The cells were then stimulated for 24 h with growth factors in the absence (vehicle alone) or presence of PD 98059. Protein synthesis was measured by [³H]leucine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. **A**, quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min with the indicated concentrations of PD 98059 and then stimulated with 100 nM AII in the continuous presence of the inhibitor. **B**, quiescent rat aortic SMC were pretreated (filled bars) or not (open bars) with 30 μ M PD 98059 and then stimulated with the following growth factors: medium alone; 1 unit/ml thrombin (*Thr*), 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (*PMA*), 1 μ g/ml insulin (*Ins*), and 30 ng/ml basic fibroblast growth factor (*FGF*). Results are presented as percentage of the basal rate of protein synthesis in the absence of inhibitor.

examine the relative contribution of the ERK and p70^{S6K} pathways to the overall regulation of protein synthesis. Simultaneous treatment of aortic SMC with 30 μ M PD 98059 and 10 ng/ml rapamycin, concentrations which maximally inhibit the AII response (Fig. 4A and Ref. 38), had a significant additive effect on the inhibition of AII-induced protein synthesis when compared to the effect of each drug alone (Fig. 5). These results suggest that p44^{mapk}/p42^{mapk} and p70^{S6K} operate via distinct signaling pathways to increase the rate of protein synthesis in rat aortic SMC.

DISCUSSION

ERK isoforms are coordinately activated in response to a wide range of mitogenic and non-mitogenic stimuli (14, 27). Evidence for a physiologically relevant role of these enzymes in growth factor-dependent cell proliferation and cell differentiation have been obtained from a combination of pharmacological, biochemical, and genetic approaches (54–56). Biochemical studies have shown that ERKs can phosphorylate a large number of proteins, including transcription factors, protein kinases, cytosolic enzymes, and others (27, 57). Despite these observations, the precise role of the ERK pathway in several growth-related processes remains largely unknown. In this study, we have used a synthetic MEK inhibitor to investigate the involvement of ERK isoforms in the stimulation of global protein synthesis by growth factors in rat aortic SMC. This compound,

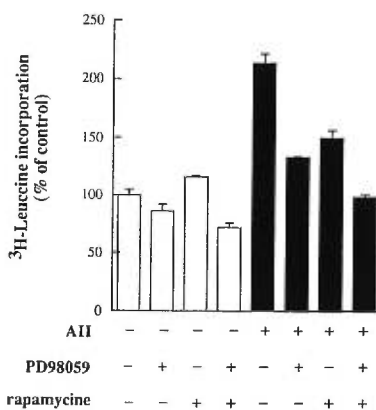


FIG. 5. Additive effect of rapamycin and PD 98059 on AII-stimulated protein synthesis in rat aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated in the absence or presence of 30 μ M PD 98059 and/or 10 ng/ml rapamycin for 30 min. The cells were then stimulated for 24 h with 100 nM AII in the continuous presence of the inhibitor drugs. Protein synthesis was measured by [³H]leucine incorporation and each value represent the mean \pm S.E. of triplicate determinations. Results are presented as percentage of the basal rate of protein synthesis in the absence of inhibitor.

PD 98059, was found to selectively block the phosphorylation and activity of MEK1 and MEK2 and, as a consequence, of p44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms in intact cells. We report that PD 98059 potentially inhibits growth factor-stimulated leucine incorporation, demonstrating for the first time, a direct role of the ERK pathway in the overall regulation of protein synthesis.

Previous studies from our laboratory have clearly shown that activation of the ERK pathway is not sufficient to mediate the increased rate of protein synthesis by AII in rat aortic SMC. We have demonstrated that treatment of aortic SMC with rapamycin, which totally blocks the activation of p70^{S6K} by AII, causes a major but incomplete inhibition of AII-stimulated protein synthesis (38). However, the activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} is not affected by rapamycin under similar conditions. The observation that rapamycin never completely inhibit AII-stimulated protein synthesis suggested that additional signaling pathways, such as the ERK pathway, were recruited by AII to regulate the rate of protein synthesis. More recently, we have shown that inhibition of tyrosine phosphorylation by the tyrosine kinase inhibitors genistein and herbimycin A results in a complete inhibition of AII-stimulated protein synthesis in rat aortic SMC (49). Again, the two inhibitors do not interfere with the activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} in these cells. Finally, we have recently observed that a variety of agents known to elevate the intracellular concentration of cyclic AMP potently inhibit the stimulatory effect of AII on protein synthesis, without affecting AII-dependent activation of ERK or MEK isoforms in rat aortic SMC.³

The site of action of ERK isoforms in the control of protein synthesis is not known. Activation of protein synthesis involves changes not only at the level of mRNA translation but also in transcriptional processes. While the role of ERKs has been well characterized in the latter (58–60), their involvement in the regulation of translational processes remains hypothetical. It has been recently proposed that ERKs mediate insulin-dependent phosphorylation of the translational repressor 4E-BP1 (also known as PHAS-I), thereby providing a direct link between these enzymes and the translational machinery (61). This hypothesis was based on the observation that ERK efficiently

phosphorylates 4E-BP1 on a single serine residue (serine 64) *in vitro* and that phosphorylation markedly decreases its affinity for eIF-4E (61, 62). This serine site is also phosphorylated *in vivo* in adipocytes in response to insulin (62). However, more recent studies indicate (63)⁴ that p44^{mapk} or p42^{mapk} are unlikely to play a major role in the phosphorylation of 4E-BP1 in intact cells.⁵ We have found that 4E-BP1 is phosphorylated on several residues in addition to the single ERK site and that the latter is not phosphorylated at a time when ERKs activity is already high in aortic SMC.⁵ Another potential mechanism by which ERK isoforms could modulate the rate of translation initiation is by regulating the phosphorylation level of eIF-2B. eIF-2B is a guanine nucleotide-exchange factor which plays a critical role in translation initiation by mediating the recycling of eIF-2 (5). It has been recently reported that GSK3 can phosphorylate the largest subunit of eIF-2B *in vitro* (65), possibly leading to inhibition of eIF-2B activity (5). Interestingly, the α and β isoforms of GSK3 are rapidly inactivated by insulin treatment *in vivo* (65, 66) and by phosphorylation with p90^{RSK} *in vitro* (67, 68). Since the activity of p90^{RSK} is under control of ERKs (13), this could provide a link between the ERK pathway and eIF-2B. However, several important issues need to be resolved to establish the relevance of this pathway.

Interestingly, we report here that PD 98059 and rapamycin exert additive inhibitory effects on AII-stimulated leucine incorporation, providing strong evidence that the ERK pathway and p70^{S6K} regulate global protein synthesis by distinct mechanisms. It has been demonstrated that rapamycin selectively represses translation of mRNAs containing a polypyrimidine tract immediately after their cap structure (69, 70). This family of mRNAs includes transcripts for elongation factors and ribosomal proteins. More recently, rapamycin was shown to block growth factor-dependent phosphorylation of 4E-BP1 (63, 71, 72) and, most importantly, to reduce cap-dependent initiation of translation (72). In addition to its effects on translation, rapamycin also exert some actions at the level of transcription (reviewed in Ref. 73). For example, a recent study has shown that rapamycin inhibits serum-induced cAMP-responsive element modulator activation by preventing its phosphorylation by p70^{S6K} (64). An interesting challenge will be to determine how signals from ERKs and p70^{S6K} are integrated to increase the global rate of protein synthesis.

In conclusion, the results presented here indicate that activation of the ERK pathway is necessary but not sufficient for growth factor-induced protein synthesis in vascular SMC. Further work is required to address the exact role of ERK isoforms in the nuclear and cytoplasmic events controlling the rate of protein synthesis.

Acknowledgments—We thank Dr. Alan Saltiel (Parke-Davis) for the generous gift of PD 98059, Dr. Frederick Hall for supply of p70^{S6K} antiserum, Drs. Gilles L'Allemain and Jacques Pouyssegur for the anti-MAPKK serum, Elisabeth Pérès for preparation of the figures, and Irène Rémillard for secretarial assistance. We are also grateful to Dr. André De Léan and Normand McNicoll for access to their computer facilities.

REFERENCES

1. Pardee, A. B. (1989) *Science* **246**, 603–608
2. Turla, M. B., Thompson, M. M., Corjay, M. H., and Owens, G. K. (1991) *Circ. Res.* **68**, 288–299
3. Kimball, S. R., Vary, T. C., and Jefferson, L. S. (1994) *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 321–348
4. Patton, W. F., Erdjument-Bromage, H., Marks, A. R., Tempst, P., and Taubman, M. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21404–21410
5. Redpath, N. T., and Proud, C. G. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1220**, 147–162

⁴ von Manteuffel, S. R., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., and Thomas, G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4076–4080.

⁵ M. Fleurent, A.-C. Gingras, N. Sonenberg, and S. Meloche, submitted for publication.

³ E. Giasson, M. J. Servant, and S. Meloche, submitted for publication.

6. Pouyssegur, J., and Seuwen, K. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 195-210
7. Kozma, S. C., and Thomas, G. (1992) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **119**, 123-155
8. Johnson, G. L., and Vaillancourt, R. R. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 230-238
9. Marshall, C. J. (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 82-89
10. Davis, R. J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 470-473
11. Cano, E., and Mahadevan, L. C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 117-122
12. Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **270**, 14843-14846
13. Sturgill, T. W., and Wu, J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1092**, 350-357
14. Cobb, M. H., Boulton, T. G., and Robbins, D. J. (1991) *Cell Regul.* **2**, 965-978
15. Ahn, N. G., Seger, R., and Krebs, E. G. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 992-999
16. Crews, C. M., and Erikson, R. L. (1993) *Cell* **74**, 215-217
17. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X.-F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1992) *Nature* **358**, 417-421
18. Dent, P., Haser, W., Haystead, T. A. J., Vincent, L. A., Roberts, T. M., and Sturgill, T. W. (1992) *Science* **257**, 1404-1407
19. Howe, L. R., Leever, S. J., Gomez, N., Nakielny, S., Cohen, P., and Marshall, C. (1992) *Cell* **71**, 335-342
20. MacDonald, S. G., Crews, C. M., Wu, L., Driller, J., Clark, R., Erikson, R. L., and McCormick, F. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6615-6620
21. Vaillancourt, R. R., Gardner, A. M., and Johnson, G. L. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6522-6530
22. Jaiswal, R. K., Moodie, S. A., Wolfman, A., and Landreth, G. E. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6944-6953
23. Moodie, S. A., Paris, M. J., Kolch, W., and Wolfman, A. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7153-7162
24. Reuter, C. W. M., Catling, A. D., Jelinek, T., and Weber, M. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7644-7655
25. Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F., and Cooper, J. A. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2546-2553
26. Lange-Carter, C. A., Pleiman, C. M., Gardner, A. M., Blumer, K. J., and Johnson, G. L. (1993) *Science* **260**, 315-319
27. L'Allemain, G. (1994) *Prog. Growth Factor Res.* **5**, 291-334
28. Meloche, S., Seuwen, K., Pagès, G., and Pouyssegur, J. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 845-854
29. Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13369-13375
30. Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8319-8323
31. Sun, H., Tonks, N. K., and Bar-Sagi, D. (1994) *Science* **266**, 285-288
32. Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C. J. (1994) *Cell* **77**, 841-852
33. Fukuda, M., Gotoh, Y., Tachibana, T., Dell, K., Hattori, S., Yoneda, Y., and Nishida, E. (1995) *Oncogene* **11**, 239-244
34. Pang, L., Sawada, T., Decker, S. J., and Saltiel, A. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13585-13588
35. Geisterfer, A. A. T., Peach, M. J., and Owens, G. K. (1988) *Circ. Res.* **62**, 749-756
36. Berk, B. C., Vekshtein, V., Gordon, H. M., and Tsuda, T. (1989) *Hypertension* **13**, 305-314
37. Chiu, A. T., Roscoe, W. A., McCall, D. E., and Timmermans, P. B. M. W. M. (1991) *Receptor* **1**, 133-140
38. Giasson, E., and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5225-5231
39. Timmermans, P. B. M. W. M., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. M., and Smith, R. D. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**, 205-251
40. Catt, K. J., Sandberg, K., and Balla, T. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M. K., Phillips, M. I., and Summers, C., eds) pp. 307-356, CRC Press, Inc., Boca Raton
41. Tsuda, T., Kawahara, Y., Ishida, Y., Koide, M., Shii, K., and Yokoyama, M. (1992) *Circ. Res.* **71**, 620-630
42. Duff, J. L., Berk, B. C., and Corson, M. A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 257-264
43. 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
44. Meloche, S. (1995) *J. Cell. Physiol.* **163**, 577-588
45. Wang, Y., Simonson, M. S., Pouyssegur, J., and Dunn, M. J. (1992) *Biochem. J.* **287**, 589-594
46. Servant, M., Guillemette, G., and Morisset, J. (1995) *Biochem. J.* **305**, 103-110
47. De Léan, A., Munson, P. J., and Rodbard, D. (1978) *Am. J. Physiol.* **235**, E97-E102
48. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27489-27494
49. Leduc, J., Haddad, P., Giasson, E., and Meloche, S. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**, 582-592
50. Tsuda, T., Kawahara, Y., Shii, K., Koide, M., Ishida, Y., and Yokoyama, M. (1991) *FEBS Lett.* **285**, 44-48
51. Molloy, C. J., Taylor, D. S., and Weber, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7338-7345
52. Leduc, I., and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4401-4404
53. Turner, C. E., Pietras, K. M., Taylor, D. S., and Molloy, C. J. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 333-342
54. Ruderman, J. V. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 207-213
55. Lenormand, P., Pagès, G., Sardet, C., L'Allemain, G., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1993) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**, 237-244
56. Marshall, C. J. (1995) *Cell* **80**, 179-185
57. Davis, R. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14553-14556
58. Edwards, D. R. (1994) *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 239-244
59. Hill, C. S., and Treisman, R. (1995) *Cell* **80**, 199-211
60. Karin, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486
61. 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
62. 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
63. Lin, T. A., Kong, X., Saltiel, A. R., Blackshear, P. J., and Lawrence, J. C., Jr. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18531-18538
64. de Groot, R. P., Ballou, L. M., and Sassone-Corsi, P. (1994) *Cell* **79**, 81-91
65. Welsh, G. I., and Proud, C. G. (1993) *Biochem. J.* **294**, 625-629
66. Ramakrishna, S., and Benjamin, W. B. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 12677-12681
67. Sutherland, C., Alterio, J., Campbell, D. G., Le Bourdellès, B., Mallet, J., Haavik, J., and Cohen, P. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217**, 715-722
68. Sutherland, C., and Cohen, P. (1994) *FEBS Lett.* **338**, 37-42
69. Jefferies, H. B. J., Reihard, C., Kozma, S. C., and Thomas, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4441-4445
70. Terada, N., Patel, H. R., Takase, K., Kohno, K., Nairn, A. C., and Gelfand, E. W. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11477-11481
71. 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
72. Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N., and Sonenberg, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 658-664
73. Chou, M. M., and Blenis, J. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 806-814

Résumé d'article

Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells

par

Edith Giasson, Marc J. Servant et Sylvain Meloche

L'AMPc est un second messenger impliqué dans le contrôle de la croissance de plusieurs types cellulaires. En effet, selon l'origine de la cellule et son stade de différenciation, l'AMPc inhibe ou bien stimule la croissance cellulaire. Cette étude a donc été entreprise afin de vérifier l'effet d'une élévation de l'AMPc sur la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV. Le traitement avec des agents pharmacologiques induisant une élévation intracellulaire de l'AMPc a inhibé complètement la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV mais également dans des fibroblaste de rat exprimant le récepteur AT₁ humain. L'inhibition était dépendante de la dose utilisée et était observée à toutes les concentrations d'Ang II utilisées. Afin de déterminer les bases moléculaires de l'action de l'AMPc, nous avons analysé les actions de la forskoline et de l'IBMX sur plusieurs effets relayés par le sous-type de récepteur AT₁. Une élévation de l'AMPc n'a pas affecté les propriétés pharmacologiques classiques du récepteur AT₁ et n'a également pas modifié l'activation de la phospholipase C ou l'induction des gènes précoces par l'Ang II. De même, l'activation de la p70^{S6k} et les deux isoformes ERK1/2 par l'Ang II n'est pas affectée suite à ce traitement. Cependant, une élévation d'AMPc a inhibé spécifiquement la phosphorylation sur résidus tyrosine de protéines adaptatrice et protéine kinase tels que la paxilline et Tyk2 respectivement. Ces résultats identifient un nouveau mécanisme par lequel l'AMPc exerce ces propriétés sur la croissance cellulaire. De plus, ils démontrent un rôle possiblement important de la paxilline et de Tyk2 dans les actions hypertrophiantes de l'Ang II dans les CMLV.

Cyclic AMP-mediated Inhibition of Angiotensin II-induced Protein Synthesis Is Associated with Suppression of Tyrosine Phosphorylation Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells*

(Received for publication, March 31, 1997, and in revised form, July 3, 1997)

Edith Giasson, Marc J. Servant[‡], and Sylvain Meloche[§]

From the Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal and Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

In the present study, we have examined the effect of increased cyclic AMP (cAMP) levels on the stimulatory action of angiotensin II (Ang II) on protein synthesis. Treatment with cAMP-elevating agents potently inhibited Ang II-induced protein synthesis in rat aortic smooth muscle cells and in rat fibroblasts expressing the human AT₁ receptor. The inhibition was dose-dependent and was observed at all concentrations of the peptide. To explore the mechanism of cAMP action, we have analyzed the effects of forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine on various receptor-mediated responses. Elevation of cAMP did not alter the binding properties of the AT₁ receptor and did not interfere with the activation of phospholipase C or the induction of early growth response genes by Ang II. Likewise, Ang II-dependent activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 and p70 S6 kinase was unaffected by cAMP. In contrast, we found that increased concentration of cAMP strongly inhibited the stimulatory effect of Ang II on protein tyrosine phosphorylation. Specifically, cAMP abolished Ang II-induced tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin and of the tyrosine kinase Tyk2. These results identify a novel mechanism by which the cAMP signaling system may exert growth-inhibitory effects in specific cell types.

Cyclic AMP (cAMP) is a pleiotropic second messenger that has been implicated as a modulator of cell proliferation in several cell types. Intriguingly, depending on the cellular origin and the differentiation state of the cell, cAMP is found to cause either growth inhibition or growth stimulation. For example, elevation of intracellular cAMP stimulates the proliferation of thyrocytes, keratinocytes, epithelial cells, hepatocytes, and Swiss 3T3 cells. On the contrary, elevated cAMP inhibits cell proliferation in fibroblasts, SMC,¹ lymphoid cells, and many

tumor cells (for review, see Refs. 1–5). In these cells, cAMP interferes with the mitogenic response to growth factors acting on both receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors (6). In addition to their effect on cell proliferation, cAMP analogs can also partially reverse the phenotype of transformed fibroblasts as well as other cancer cells (5, 7).

The regulatory effects of cAMP are mediated through activation of the multifunctional cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A or PKA) (8). These effects are exerted both at the post-translational level and at the transcriptional level through phosphorylation of cAMP-responsive element-binding proteins (CREB/ATF family) (9, 10). Although considerable progress has been made in understanding the mechanism of gene regulation by cAMP, little is known about the molecular mechanisms by which the nucleotide modulates cell growth. A number of studies have proposed that cAMP might inhibit cell proliferation by interfering with Ras-dependent activation of MAP kinases (11–15). Biochemical analysis of the various intermediates in the signaling cascade indicated that cAMP inhibits signal transmission by preventing Ras-dependent activation of the serine/threonine kinase Raf-1 (11, 12, 15). This inhibitory effect of cAMP was mediated by PKA because it was not observed in mutant cells that express a PKA resistant to activation by cAMP (14). However, treatment of CCL39 fibroblasts (16) or interleukin-2-dependent T lymphocytes (17) with cAMP-raising agents was found to block cell proliferation completely without affecting growth factor-induced MAP kinase activation. Another study reported that treatment of murine macrophages with analogs of cAMP raises the overall amount of the inhibitor p27^{kip1}, thereby increasing its association with cyclin D-Cdk4 and preventing the activation of Cdk4 (18). cAMP was also shown to reduce the accumulation of *c-myc* mRNA in various cell lines (19–22). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, PKA exercises regulatory control on both growth and division, suggesting a role for cAMP in the homeostatic integration of these two processes (23, 24). It is not known whether cAMP exerts similar control on the overall rate of protein synthesis in mammalian cells under conditions of growth factor stimulation or cellular stress.

Ang II is a growth factor for a number of cell types, including adrenocortical cells, proximal tubular cells, vascular SMC, cardiac myocytes, and cardiac fibroblasts (for review, see Refs. 25 and 26). In cultured aortic SMC, Ang II induces cellular hypertrophy as a result of increased protein synthesis but not cell proliferation (27–30). The growth-promoting effects of the peptide are mediated by the AT₁ receptor subtype, a member of the superfamily of G protein-coupled receptors. Agonist binding to the AT₁ receptor stimulates the activity of phospholipase C, to generate the second messengers InsP₃ and diacylglycerol, and inhibits the activity of adenylyl cyclase (for review, see Refs. 31 and 32). One of the immediate consequences of these early

* This work was supported by grants from the Heart and Stroke Foundation of Canada and 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 Heart and Stroke Foundation of Canada studentship.
[§] Scholar of the Medical Research Council of Canada. To whom correspondence should be addressed: Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal, 3850 St. Urbain St., Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada. Fax: 514-843-2715; E-mail: meloches@ere.umontreal.ca.

¹ The abbreviations used are: SMC, smooth muscle cell(s); PKA, cAMP-dependent protein kinase; MAP, mitogen-activated protein; Cdk, cyclin-dependent kinase; Ang II, angiotensin II; InsP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; ERK, extracellular signal-regulated kinase; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; mAb, monoclonal antibody; MEK, MAP kinase/ERK kinase; kb, kilobase.

signals is activation of the MAP kinases ERK1/ERK2 (33–35) and the 70/85-kDa S6 protein kinases (referred to as p70^{S6K}) (30). Activation of the AT₁ receptor also leads to increased tyrosine phosphorylation of multiple proteins in target cells (36–40). Despite these observations, the nature of the signaling mechanisms coupling the AT₁ receptor to the hypertrophic response remains poorly understood.

The aim of this study was to evaluate the effect of increased intracellular levels of cAMP on Ang II-stimulated protein synthesis in vascular SMC. We show that cAMP-raising agents potentially inhibit the hypertrophic effect of Ang II. In addition, we demonstrate that increased cAMP selectively antagonizes the stimulatory effect of Ang II on protein tyrosine phosphorylation in these cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and Antibodies—¹²⁵I-labeled [Sar¹,Ile⁶]Ang II (sarile) was prepared by radioiodination of sarile using a solid phase method as described (41). Forskolin, IBMX, *Vibrio cholerae* toxin and 8-bromo-cAMP were obtained from Calbiochem. Forskolin and IBMX were dissolved in dimethyl sulfoxide to give stock solutions of 100 mM and 500 mM, respectively. Cholera toxin was dissolved in water at a concentration of 1 mg/ml, and 8-bromo-cAMP was dissolved in 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) at a concentration of 100 mM. Isoproterenol was a gift of Dr. Michel Bouvier (University of Montreal) and was prepared as a 0.5 M solution in 10% ascorbic acid. The source of other materials has been described (30).

Antisera SM1 and α Icp42 have been described and specifically immunoprecipitate the MAP kinases ERK1 and ERK2, respectively (42, 43). Antiserum S6-24 was produced in rabbits against a synthetic peptide corresponding to amino acids 2–30 of rat p70^{S6K} (Quality Controlled Biochemicals). The anti-p125^{FAK} mAb 2A7 was generously provided by Dr. Thomas Parsons (University of Virginia). The anti-Shc serum was provided by Dr. Louise Larose (McGill University). The anti-paxillin and anti-Pyk2 mAbs were purchased from Transduction Laboratories. The anti-phosphotyrosine mAb 4G10 and anti-Tyk2 polyclonal antibody were obtained from Upstate Biotechnology and Santa-Cruz Biotechnology, respectively.

Cell Culture—Rat aortic SMC were cultured and synchronized as described previously (30). Rat1-AT₁ cells are Rat1 fibroblasts stably expressing the human Ang II AT₁ receptor.² Rat1-AT₁ cells were grown in minimum essential medium supplemented with 10% calf serum, 2 mM glutamine, antibiotics, and 0.4 mg/ml Geneticin. They were made quiescent by incubating confluent cell cultures in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 medium containing 15 mM Hepes (pH 7.4) and 0.1% bovine serum albumin for 24 h. For experiments with cAMP-raising agents, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated concentrations of agents for 30 min before the addition of Ang II.

Measurement of Cyclic AMP—The intracellular mass of cAMP was determined by a specific protein binding assay (44). Quiescent cells in 35-mm Petri dishes were incubated with the indicated agents for 20 min at 37 °C. After incubation, the medium was removed and the cells washed twice with 1 ml of ice-cold phosphate-buffered saline. The cells were then scraped into 500–1,000 μ l of cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM EDTA, boiled for 5 min, and centrifuged at 13,000 \times g for 5 min at 4 °C. An aliquot of 50–100 μ l of cell extract was analyzed for cAMP content using a competitive protein binding assay kit as recommended by the manufacturer (Diagnostic Products Corporation).

Receptor Binding Assay—Membranes from rat aortic SMC were prepared as described (45). Competition binding studies were carried out by incubating aortic SMC membranes (50 μ g) for 1 h at 25 °C with 0.2 nM ¹²⁵I-sarile and varying concentrations of Ang II in a total volume of 250 μ l of binding buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, and 0.1% heat-inactivated bovine serum albumin). Bound ¹²⁵I-sarile was separated from free ligand by rapid filtration through GF/B filters presoaked with 0.2% bovine serum albumin, followed by washing with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl. The filters were counted for radioactivity. Averages of duplicate determinations of bound ¹²⁵I-sarile were used for data analysis. Binding data were analyzed by nonlinear least squares curve fitting using the SCAFIT computer program (46).

² S. Meloche, M. J. Servant, I. Leduc, and J. Pellerin, submitted for publication.

Measurement of InsP₃—The intracellular mass of InsP₃ was measured by a specific radioreceptor assay as described previously (40). Averages of duplicate determinations of bound [³H]InsP₃ were used for data analysis. The mass of InsP₃ is expressed as pmol of InsP₃ produced/mg of protein.

Protein Kinase Assays—Quiescent aortic SMC in 60-mm Petri dishes were stimulated with 10 nM Ang II for either 5 min (ERK assays), 3 min (MEK assays), or 15 min (p70^{S6K} assays). The enzymatic activity of ERK isoforms was measured by specific immune complex kinase assays using myelin basic protein as substrate as described (30, 42). The phosphotransferase activity of p70^{S6K} was measured by an immune complex kinase assay using the S6 peptide RRRLLSSLRA (Upstate Biotechnology) as substrate (30). The enzymatic activity of MEK1 and MEK2 was assayed by measuring their ability to increase the myelin basic protein kinase activity of recombinant ERK1 *in vitro* (33).

Northern Blot Analysis—Quiescent aortic SMC in 100-mm Petri dishes were stimulated with 10 nM Ang II for the indicated times at 37 °C. Total RNA was extracted with guanidinium thiocyanate as described (47). Equal amounts of total RNA (10–20 μ g) were denatured by heating for 15 min at 65 °C in 2.2 M formaldehyde and 50% formamide and resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel containing 1.8% formaldehyde. The RNA was transferred to Hybond-N (Amersham) nylon membranes by vacuum blotting, fixed, and hybridized with ³²P-labeled probes. Hybridization was carried out in hybridization medium (5 \times SSC (1 \times SSC = 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 0.1% SDS, 5 \times Denhardt's solution (1 \times Denhardt's = 0.02% Ficoll 400, 0.02% polyvinylpyrrolidone, and 0.02% bovine serum albumin), 50% formamide, and 100 μ g/ml herring sperm DNA) containing the labeled probe (1–2 \times 10⁶ cpm/ml) for 16 h at 42 °C. The membranes were washed twice at 25 °C for 15 min in 2 \times SSC, 0.1% SDS, and twice at 60 °C for 30 min in 0.5 \times SSC, 0.1% SDS. The extent of hybridization was analyzed with a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics). The results were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA.

The probes used were a 0.9-kb *Pst*I fragment of mouse *c-fos* cDNA (provided by Dr. Mona Nemer, University of Montreal), a 1.1-kb *Pst*I-*Eco*RI fragment of mouse *fosB* cDNA (provided by Dr. Rodrigo Bravo, Bristol-Myers Squibb), a 0.7-kb *Hind*III fragment of mouse *egr-1* cDNA (provided by Dr. Trang Hoang, University of Montreal), a 1.8-kb *Hind*III fragment of mouse *c-myc* cDNA (provided by Dr. Alain Nepveu, McGill University), and a 1.2-kb *Xba*I-*Pst*I fragment of rat glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA. All of the probes were labeled by random priming.

Analysis of Tyrosine-phosphorylated Proteins—Quiescent aortic SMC were stimulated with 10 nM Ang II for the indicated times at 37 °C. The cells were then washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10⁻⁴ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A, 1% Triton X-100) for 30 min at 4 °C. Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 \times g for 10 min, and normalized amounts of lysate proteins (500–600 μ g) were incubated for 4 h at 4 °C with the following antibodies preadsorbed to protein A-Sepharose beads: 10 μ l of anti-paxillin, 2.5 μ l of anti-Shc, 5 μ l of anti-p125^{FAK}, 4 μ l of anti-Pyk2, or 10 μ l of anti-Tyk2. Immune complexes were washed three times with Triton X-100 lysis buffer, and the eluted proteins were separated by SDS-gel electrophoresis on 7.5% acrylamide gels and electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine. After fixation for 15 min in 40% methanol, 7% acetic acid, 3% glycerol, the membrane was blocked for 1 h at 37 °C in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 1% bovine serum albumin and then incubated for 2 h at 25 °C with mAb 4G10 (1:3,000) in blocking solution. The membrane was washed five times in Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 prior to incubation for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG diluted 1:10,000 in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 3% non-fat dry milk. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham).

For immunoblotting of total phosphotyrosyl proteins, equal amounts of lysate proteins (100 μ g) were resolved on 7.5% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes as described above. The membrane was incubated for 2 h at 25 °C with mAb 4G10 (1:3,000) in blocking solution. After washing, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated protein A (1:3,000) in Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 for 1 h. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence.

Protein Synthesis Measurements—Quiescent aortic SMC or Rat1-AT₁ cells in triplicate wells of 24-well plates were stimulated with the

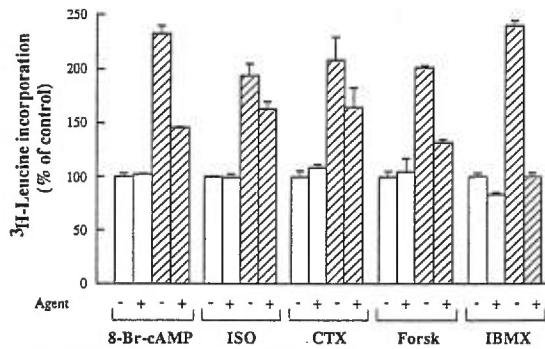


FIG. 1. Inhibition of Ang II-induced protein synthesis by agents that raise intracellular cAMP in rat aortic SMC. Rat aortic SMC were made quiescent by incubation in serum-free medium for 48 h. The cells were then stimulated (*dashed bars*) or not (*open bars*) for 24 h with 10 nM Ang II in the absence or presence of the following agents: 0.5 mM 8-bromo-cAMP (*8-Br-cAMP*), 10^{-8} M isoproterenol (*ISO*), 100 ng/ml cholera toxin (*CTX*), 10 μ M forskolin (*Forsk*), and 0.5 mM IBMX. Protein synthesis was measured by [3 H]leucine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. The data presented are representative of at least three different experiments with comparable results.

indicated concentrations of Ang II in serum-free medium containing 0.5 μ Ci/ml [3 H]leucine. After 24 h of stimulation, the medium was aspirated, and the cells were incubated for a minimum of 30 min in cold 5% trichloroacetic acid. The wells were then washed once with trichloroacetic acid and three times with tap water. The radioactivity incorporated into trichloroacetic acid-precipitable material was measured by liquid scintillation counting after solubilization in 0.1 M NaOH. Where indicated, the cells were stimulated for 24 h with Ang II in the continuous presence of cAMP-elevating agents.

Other Methods—Protein concentrations were measured using the BCA protein assay kit (Pierce) with bovine serum albumin as standard. Dose-response curves were analyzed according to a four-parameter logistic equation using the ALLFIT computer program (48).

RESULTS

Increased cAMP Inhibits Ang II-stimulated Protein Synthesis in Aortic SMC—Ang II is a hypertrophic factor that potently stimulates protein synthesis in rat aortic SMC but has no effect on DNA synthesis or cell proliferation (27–30). To examine the effect of cAMP on the growth response to Ang II, aortic SMC were treated with a variety of agents known to increase intracellular cAMP, and the rate of protein synthesis was determined by [3 H]leucine incorporation. As shown in Fig. 1, the addition of cAMP-raising agents strongly inhibited the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis, without affecting the basal rate of protein synthesis. All of these agents were found to raise the intracellular concentration of cAMP significantly (data not shown). The growth-inhibitory effect of cAMP was reversible, and no sign of long term cytotoxicity was observed at the concentrations of agents used. The cAMP phosphodiesterase inhibitor IBMX and the adenylyl cyclase activator forskolin were the most effective inhibitors, reducing the trophic effect of Ang II by 100 and 70%, respectively. These two compounds were therefore used in all subsequent experiments.

Pharmacological studies revealed that forskolin and IBMX block Ang II-induced leucine incorporation in a dose-dependent manner. Half-maximal inhibition was observed at a concentration of 0.5 ± 0.2 μ M forskolin and 79 ± 18 μ M IBMX (Fig. 2). We also analyzed the effect of the two inhibitors on the rate of protein synthesis at different concentrations of Ang II. Fig. 3 shows that treatment with forskolin or IBMX inhibited the induction of protein synthesis by every concentration of the peptide. The half-maximal effect of Ang II on protein synthesis was found to be similar in the absence or in the presence of either forskolin or IBMX. Taken together, these results dem-

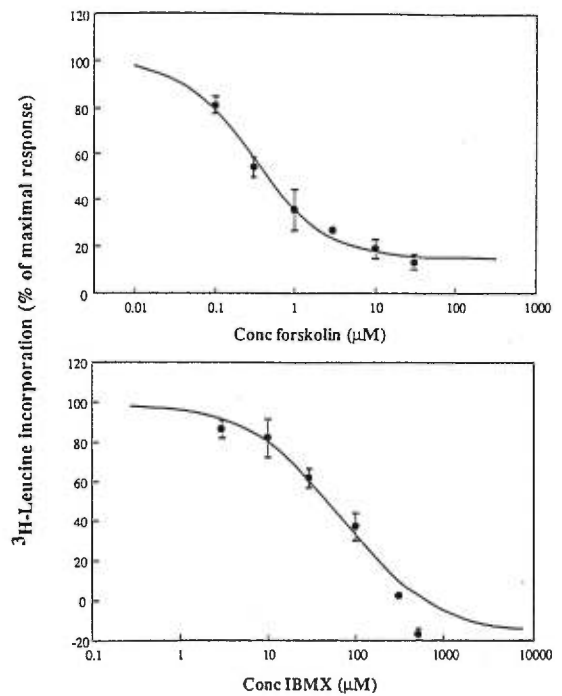


FIG. 2. Concentration-dependent inhibition of Ang II-stimulated protein synthesis by forskolin and IBMX in rat aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were stimulated for 24 h with 10 nM Ang II in the absence (vehicle alone) or presence of the indicated concentrations of forskolin (*upper panel*) or IBMX (*lower panel*). Protein synthesis was measured by [3 H]leucine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. Similar results were obtained in four separate experiments.

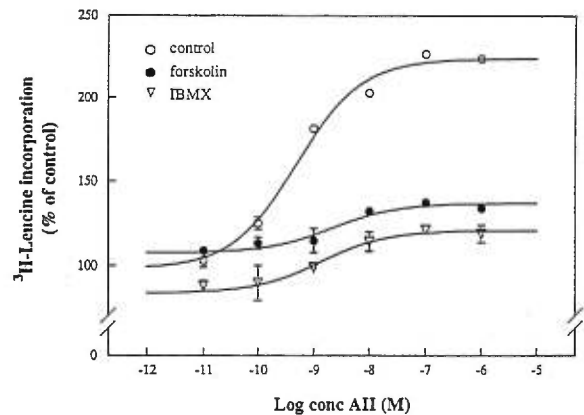


FIG. 3. Effect of forskolin and IBMX on the dose dependence of Ang II for the stimulation of protein synthesis. Quiescent rat aortic SMC were stimulated for 24 h with the indicated concentrations of Ang II in the absence (\circ) or presence of 10 μ M forskolin (\bullet) or 0.1 mM IBMX (∇). Protein synthesis was measured by [3 H]leucine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. Similar results were obtained in three different experiments.

onstrate that elevation of intracellular levels of cAMP, through different cellular mechanisms, antagonizes the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis. This inhibitory effect of cAMP is presumably mediated by activation of PKA.

Elevation of cAMP Does Not Interfere with Ang II Early Signaling Events—To explore the mechanism by which cAMP interferes with the activation of protein synthesis by Ang II, we examined the effects of forskolin and IBMX on various recep-

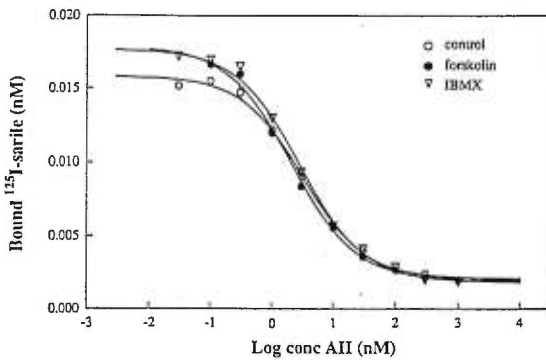


FIG. 4. Effect of increased cAMP on the binding properties of the AT₁ receptor. Quiescent rat aortic SMC were pretreated in the absence (○) or presence of 10 μM forskolin (●) or 0.1 mM IBMX (▽) for a period of 30 min. Cell membranes were prepared and incubated for 1 h at 25 °C with 0.2 nM ¹²⁵I-sarile and varying concentrations of Ang II. Bound ¹²⁵I-sarile was determined by rapid filtration on GF/B filters. Data points for each curve were obtained from a single representative experiment with duplicate determination of each point. The solid lines represent the computerized least squares fit of the data. Similar results were obtained in two independent experiments.

tor-mediated responses. Ang II has been shown to exert its hypertrophic effect through activation of the AT₁ receptor subtype, a member of the superfamily of G protein-coupled receptors (29, 30). We first tested the effect of increased cAMP levels on the agonist binding properties of the AT₁ receptor by performing competition binding studies in membranes derived from either control cells or cells treated with forskolin or IBMX. As shown in Fig. 4, treatment with cAMP-raising agents did not change the total number of membrane AT₁ receptor sites. Computer analysis by nonlinear regression revealed that Ang II competition binding data are best explained by a model with two different affinity states of the receptor. The proportion of high affinity sites and the affinity for Ang II (control, $K_d = 2.1$ nM; forskolin, $K_d = 1.1$ nM; IBMX, $K_d = 1.6$ nM) was similar in control cells and cAMP-treated cells, indicating that elevation of cAMP does not interfere with the initial coupling of the AT₁ receptor with G proteins.

We next analyzed the effect of cAMP on phospholipase C activation by measuring the intracellular mass of InsP₃. Ang II binding to the AT₁ receptor has been shown to stimulate the activity of phospholipase C in aortic SMC and in many other target cells rapidly (31, 32). Pretreatment of the cells with either forskolin or IBMX did not prevent the rapid increase in the production of InsP₃ induced by Ang II (Fig. 5). These results indicate that cAMP does not inhibit the growth effect of Ang II by interfering with early receptor-mediated signaling events.

Elevation of cAMP Does Not Inhibit Ang II-dependent Activation of ERK1/ERK2 and p70^{S6K}—In common with growth factors, Ang II potently stimulates the enzymatic activity of the MAP kinase isoforms ERK1/ERK2 in vascular SMC (30, 33–35). In view of the demonstration that PKA antagonizes growth factor-induced Ras-dependent activation of MAP kinases in a number of cell types (11–15), we sought to determine if the inhibitory effect of cAMP on Ang II-induced protein synthesis resulted from a negative regulatory effect on the MAP kinases ERK1/ERK2. Quiescent aortic SMC were treated with forskolin or IBMX prior to Ang II stimulation, and the activity of ERK isoforms was determined by specific immune complex kinase assays. In contrast to the above mentioned results, elevation of cAMP levels did not affect Ang II-dependent activation of ERK1 and ERK2 isoforms in rat aortic SMC (Fig. 6). Detailed kinetic analysis also confirmed that cAMP does not alter the time course of ERK1/ERK2 activation by Ang II (data not

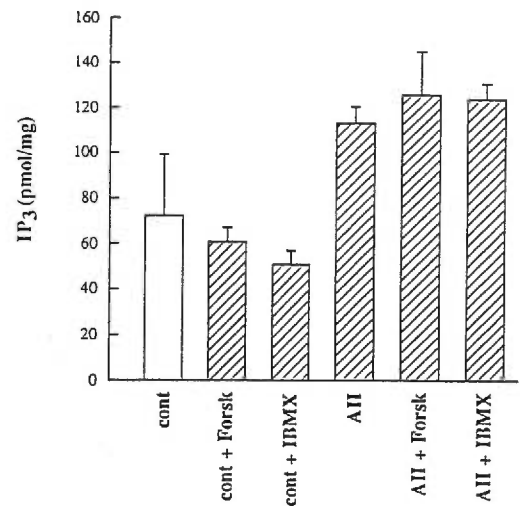


FIG. 5. Activation of phospholipase C by Ang II is not impaired in rat aortic SMC treated with cAMP-elevating agents. Quiescent rat aortic SMC were pretreated with vehicle alone or with either 10 μM forskolin (*Forsk*) or 0.1 mM IBMX for 30 min. The cells were then stimulated with medium (*cont*) or 10 nM Ang II for 15 s. The intracellular content of InsP₃ was measured by a specific radioreceptor assay as described under "Experimental Procedures." Similar results were obtained in four separate experiments.

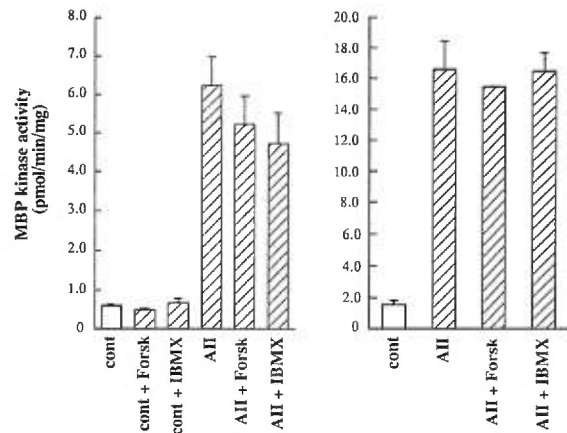


FIG. 6. Elevation of cAMP does not interfere with Ang II-dependent activation of the MAP kinases ERK1/ERK2 in rat aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated with vehicle alone or with either 10 μM forskolin (*Forsk*) or 0.1 mM IBMX for 30 min. The cells were then stimulated or not (*cont*) with 10 nM Ang II for 5 min. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with ERK1 antiserum (*left panel*) or ERK2 antiserum (*right panel*) 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 pmol of phosphate incorporated into the substrate/min/mg of lysate protein and represent the mean ± S.D. of duplicate determinations. The data presented are representative of seven independent experiments with similar results.

shown). We also examined the effect of forskolin and IBMX on the activity of MEK isoforms in Ang II-stimulated cells. Ang II has been shown to activate both MEK1 and MEK2 isoforms in rat aortic SMC (33). As expected, the response to Ang II was not altered in cells treated with cAMP-raising agents (data not shown).

Another potential candidate for the inhibitory action of cAMP is the serine/threonine kinase p70^{S6K}, the major S6 protein kinase *in vivo*. We have demonstrated previously that

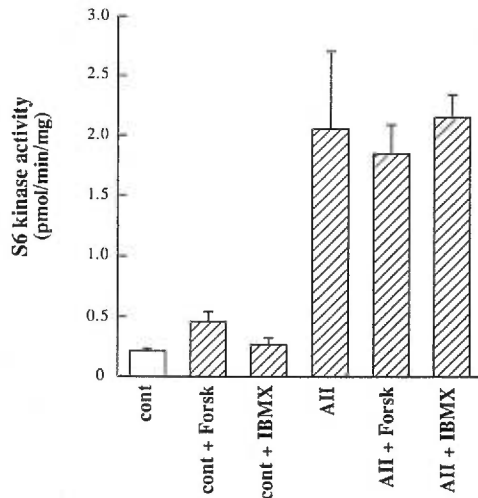


FIG. 7. Elevation of cAMP does not interfere with Ang II-dependent activation of p70^{S6K} kinase. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min with vehicle alone or with either 10 μ M forskolin (*Forsk*) or 0.1 mM IBMX prior to stimulation with medium (*cont*) or 10 nM Ang II for 15 min. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with p70^{S6K} antiserum preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The phosphotransferase activity of p70^{S6K} was assayed directly on the immune complexes using an S6 peptide as substrate. The enzymatic activities are expressed as pmol of phosphate incorporated into the peptide/min/mg of lysate protein. Each value represents the mean \pm S.D. of duplicate determinations. The data presented are representative of four independent experiments with similar results.

Ang II stimulates the phosphotransferase activity of p70^{S6K} in aortic SMC and that inhibition of this enzyme with rapamycin correlates with inhibition of Ang II-induced protein synthesis (30). To determine if cAMP antagonizes Ang II-stimulated p70^{S6K} activation, cells were treated with forskolin or IBMX, and the activity of p70^{S6K} was measured by immune complex kinase assay. Fig. 7 shows that treatment with cAMP-raising agents had no effect on Ang II-mediated activation of p70^{S6K} in rat aortic SMC. These results indicate that cAMP does not interfere with the two major protein kinase signaling cascades to exert its inhibitory action on protein synthesis.

Elevation of cAMP Does Not Prevent Ang II-stimulated Early Growth Response Genes Induction—Ang II has been shown to increase mRNA expression of the *c-fos* (49–51), *c-jun* (52), *egr-1* (53), *fosB* (54), and *c-myc* (55) genes in vascular SMC. However, the role of these early gene products in the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis remains to be established. In this study, we analyzed the effect of raising cAMP levels on mRNA expression of the *c-fos*, *fosB*, and *egr-1* genes in rat aortic SMC. Treatment of the cells with either forskolin or IBMX had no effect on the peak induction of these genes in response to Ang II stimulation (Fig. 8A). We also examined the effect of cAMP on the induction of the *c-myc* gene. Previous studies in diverse cell types have shown that elevation of cAMP can inhibit growth factor-dependent expression of *c-myc* mRNA by down-regulating the transcription of the gene (19–22). Fig. 8B shows that Ang II induced the expression of the *c-myc* gene in aortic SMC, with a peak induction observed after 2–4 h. Neither forskolin or IBMX prevented the induction of the *c-myc* gene in response to Ang II. Moreover, incubation with either compound had no effect on the time course of *c-myc* mRNA expression in Ang II-stimulated cells (data not shown). Together, these data suggest that cAMP does not inhibit the trophic effect of Ang II by blocking early growth response genes induction.

Increased cAMP Inhibits Ang II-stimulated Tyrosine Phos-

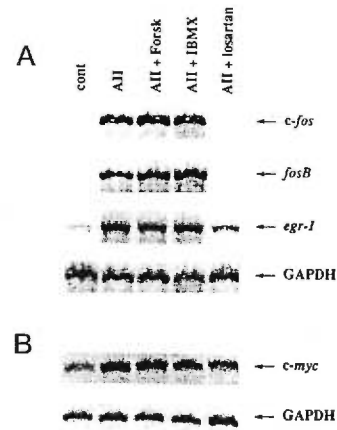


FIG. 8. Increased cAMP does not prevent the induction of early growth response genes by Ang II in rat aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min with vehicle alone or with either 10 μ M forskolin (*Forsk*) or 0.1 mM IBMX. The cells were then stimulated or not (*cont*) with 10 nM Ang II for the following times: 30 min (*c-fos*), 60 min (*egr-1* and *fosB*), or 120 min (*c-myc*). The specificity of the Ang II response was confirmed by preincubating the cells for 10 min with 10⁻⁵ M losartan prior to Ang II addition. Total cellular RNA was extracted from the cells and analyzed serially by Northern hybridization using the indicated ³²P-labeled probes as described under "Experimental Procedures." The results were normalized by rehybridization of the blots with a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) probe. The extent of hybridization was visualized and quantified by PhosphorImaging analysis. Similar results were obtained in three separate experiments.

phorylation of Cellular Proteins—Ang II stimulates tyrosine phosphorylation of multiple proteins in vascular SMC and other target cells (36–40). This signaling pathway appears to play a critical role in the hypertrophic action of Ang II because treatment of aortic SMC with selective tyrosine kinase inhibitors completely abrogates Ang II-dependent increase in protein synthesis (40). These observations led us to examine the effect of cAMP elevation on Ang II-dependent activation of tyrosine phosphorylation. Preincubation of aortic SMC with forskolin or IBMX resulted in a complete inhibition of Ang II-stimulated tyrosine phosphorylation of the 120–125- and 65–75-kDa bands, the two major substrates detected in these cells (Fig. 9A). As predicted from the enzymatic assays (see Fig. 6), treatment of cells with either compound had no influence on tyrosine phosphorylation of the MAP kinase isoforms ERK1/ERK2, clearly showing the selectivity of the cAMP inhibitory action (Fig. 9B).

We and others have identified the major 65–75-kDa tyrosine phosphorylated substrate in Ang II-treated cells as the focal adhesion-associated protein paxillin (56, 57). We therefore examined more specifically the effect of cAMP on tyrosine phosphorylation of paxillin. Addition of Ang II increased tyrosine phosphorylation of paxillin in quiescent aortic SMC, and this response was blocked completely by preincubation with either forskolin or IBMX (Fig. 9C). In contrast, neither compound prevented tyrosine phosphorylation of the adaptor protein Shc, another major target of Ang II signaling (39, 58). These observations are consistent with the idea that Ang II activates at least two tyrosine kinase pathways, one of which is sensitive to cAMP. To explore further the mechanism by which cAMP interferes with tyrosine phosphorylation signaling, we examined the effect of cAMP elevation on the tyrosine phosphorylation level of Ang II-regulated cellular tyrosine kinases. Ang II significantly increased the phosphotyrosine content of the focal adhesion-associated kinases p125^{FAK} and Pyk2 (also known as

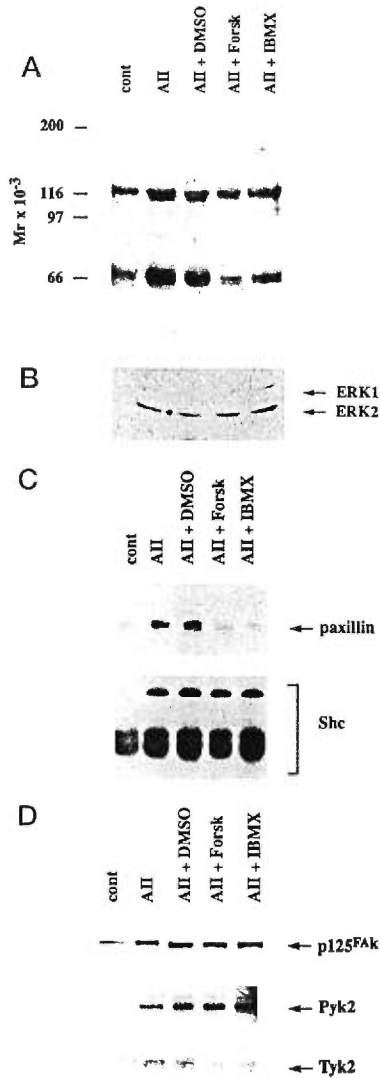


FIG. 9. Elevation of cAMP inhibits Ang II-stimulated protein tyrosine phosphorylation in rat aortic SMC. Quiescent rat aortic SMC were pretreated for 30 min in the absence or presence of vehicle (dimethyl sulfoxide) or with either 10 μ M forskolin (*Forsk*) or 0.1 mM IBMX. The cells were then stimulated or not (*cont*) with 10 nM Ang II for either 1 min (*Shc*, p125^{FAK}, Pyk2), 3 min (*panel A*, Tyk2), or 5 min (*panel B*, paxillin). *Panel A*, protein tyrosine phosphorylation. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine mAb 4G10 as described under "Experimental Procedures." *Panel B*, tyrosine phosphorylation of MAP kinases. Cell lysates were analyzed as in *panel A*. The positions of ERK1 (p44^{mapk}) and ERK2 (p42^{mapk}) isoforms are indicated by arrows. *Panel C*, tyrosine phosphorylation of paxillin and Shc. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-paxillin mAb or anti-Shc serum and analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine mAb 4G10. *Panel D*, tyrosine phosphorylation of cytosolic tyrosine kinases. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with a specific antibody to p125^{FAK}, Pyk2, or Tyk2 and analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine mAb 4G10. The data presented are representative of at least two independent experiments with similar results.

CAK beta and RAFTK) and of the Janus kinase Tyk2 in aortic SMC (Fig. 9D). Treatment of the cells with forskolin or IBMX did not affect Ang II-induced tyrosine phosphorylation of p125^{FAK} and Pyk2, thereby indicating that these tyrosine kinases are not the major paxillin kinases. However, both agents completely blocked the increased tyrosine phosphorylation of

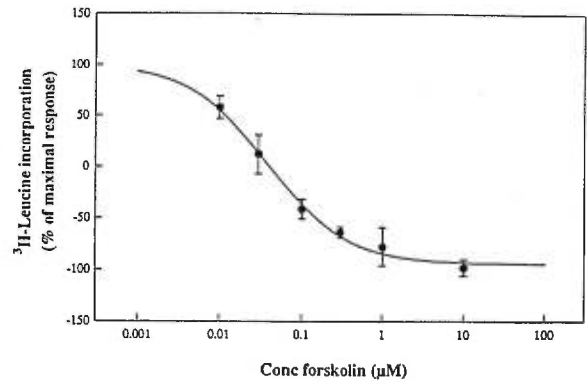


FIG. 10. Concentration-dependent inhibition of Ang II-induced protein synthesis by cAMP-elevating agents in Rat1-AT₁ cells. Rat1-AT₁ cells were made quiescent by serum deprivation for 24 h. The cells were then stimulated for 24 h with 100 nM Ang II in the absence (vehicle alone) or presence of the indicated concentrations of forskolin. Protein synthesis was measured by [3 H]leucine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. The data presented are representative of three different experiments with similar results.

Tyk2 in response to Ang II (Fig. 9D). Thus, these results provide strong evidence that raising intracellular cAMP levels interferes with Ang II-stimulated tyrosine phosphorylation in vascular SMC.

Increased cAMP Inhibits Ang II-stimulated Protein Synthesis in a Heterologous Cell Line Expressing the Human AT₁ Receptor—We have established a rat fibroblast cell line expressing a physiological number of human AT₁ receptors which shows an increased rate of protein synthesis in response to Ang II.² To determine whether the growth-inhibitory effect of cAMP was specific to the cellular context, we examined the effect of cAMP elevation on Ang II-induced protein synthesis in Rat1-AT₁ cells. As shown in Fig. 10, treatment of Rat1-AT₁ cells with forskolin completely abolished the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis. Forskolin was found to be more potent in inhibiting the trophic effect of Ang II in Rat1-AT₁ cells compared with aortic SMC, with half-maximal inhibition observed at $0.044 \pm 0.006 \mu$ M concentration. Notably, forskolin also inhibited Ang II-induced tyrosine phosphorylation in Rat1-AT₁ cells (data not shown).

DISCUSSION

The role of cAMP as a regulator of cell growth has received considerable attention since the demonstration that elevation of the intracellular level of the nucleotide can stimulate or inhibit cell proliferation (1–5). However, until recently, the mechanism by which cAMP negatively affects the proliferation of normal and transformed cells has remained largely unknown. More recent work in various cellular models has led to new hypothesis to explain cAMP action (see below). In particular, cAMP has been shown to induce G₁ arrest in macrophages by interfering with the cell cycle machinery at the level of Cdk4 activation (18). All of these studies have examined the consequences of cAMP elevation on mitogen-induced cell cycle progression and cell division. Here, we have investigated the effect of cAMP on the induction of protein synthesis by the hypertrophic factor Ang II in aortic SMC and in fibroblasts expressing the human AT₁ receptor.

We report that a variety of agents known to elevate the intracellular concentration of cAMP potently inhibit the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis (Fig. 1). The inhibition was dose-dependent and was observed at all concentrations of Ang II. Because these agents increase cAMP by

different mechanisms of action, the above data indicate that the growth-inhibitory response is mediated by the elevation of intracellular cAMP levels. The effect of cAMP is most presumably dependent on the activity of PKA, as virtually all of the effects of the nucleotide in mammalian cells are attributed to this multifunctional enzyme. Interestingly, we show that the inhibitory effect of cAMP on Ang II-induced protein synthesis is not restricted to vascular SMC but is also observed in heterologous rat fibroblasts expressing the human AT₁ receptor. These data are consistent with the idea that cAMP has a generalized effect on the signaling machinery linking the AT₁ receptor to the regulation of protein synthesis. Indeed, previous studies have shown that cAMP-elevating agents exert similar inhibitory effect on the trophic action of Ang II in epithelial cell lines of renal origin (59, 60). Similar to vascular SMC, Ang II was found to stimulate the rate of protein synthesis and to induce cellular hypertrophy in these cells, without increasing DNA content. However, the mechanism by which cAMP interferes with the hypertrophic effect of Ang II was not addressed in the latter studies. Thus, in addition to its well defined modulatory role on cell proliferation and cellular morphology, cAMP also exerts negative regulatory effects on the stimulation of protein synthesis by hypertrophic factors.

The molecular basis of the hypertrophic action of Ang II is still largely undefined. Activation of the AT₁ receptor is known to trigger multiple G protein-mediated signaling pathways, including the inhibition of adenylyl cyclase (31, 32). Based on the observation that Ang II decreases the intracellular concentration of cAMP in the renal epithelial cell lines MCT and LLC-PK₁ and that cAMP-raising agents inhibit Ang II-induced protein synthesis, it has been proposed that the hypertrophic action of the hormone may be mediated by the decrease in intracellular cAMP (59, 60). However, several lines of evidence do not support this hypothesis but rather indicate that G_i-regulated pathways are not important for the hypertrophic effect of Ang II. We have demonstrated that pretreatment of aortic SMC or Rat1-AT₁ cells with concentrations of pertussis toxin which completely prevent the decrease in cAMP levels have no effect on Ang II-induced protein synthesis.² In addition, Ang II has been shown to increase slightly the cAMP content in cardiac myocytes where it induces cellular hypertrophy potently (61). The physiological significance of the inhibition of adenylyl cyclase remains to be determined.

We have investigated the biochemical mechanism by which cAMP elevation antagonizes Ang II-induced protein synthesis in aortic SMC. We first excluded the possibility that cAMP was acting very early at the level of receptor activation. No significant effect of forskolin or IBMX was found on the total number of AT₁ receptors, the formation of high affinity receptor sites, and the activation of phospholipase C. We then examined the possibility that cAMP elevation might interfere with MAP kinase or p70^{S6K} signaling cascades. As mentioned, a number of reports have shown that cAMP-raising agents inhibit ERK1/ERK2 activation in parallel to their antiproliferative effect in several cell types (11–15). Although these findings clearly demonstrated a functional cross-talk between the MAP kinase and PKA cascades, there is no direct evidence that the inhibition of cell proliferation by cAMP can be attributed to inhibition of early MAP kinase activation. In this regard, treatment of CCL39 fibroblasts (16) or T lymphocytes (17) with concentrations of cAMP-raising agents which completely suppress growth factor-induced DNA synthesis has no effect on ERK1/ERK2 activation. In the present study, we clearly show that Ang II-dependent activation of ERK or MEK isoforms is unaffected by the elevation of cAMP levels in aortic SMC. The reason for these differential effects of PKA on the ERK path-

way is not known, but a possible explanation is that stimulation of MEK activity by distinct growth factors involves distinct MAP kinase kinase kinases that are regulated differently by PKA. Additional studies are clearly necessary to resolve this question. We also establish that increased cAMP does not interfere with the activation of p70^{S6K} by Ang II. Although much less is known on the regulation of the p70^{S6K} pathway by cAMP, a recent study has shown that cAMP elevation inhibits interleukin-2-dependent activation of p70^{S6K} in T lymphocytes (17). In contrast, results from another study in CCL39 fibroblasts showed that addition of prostaglandin E₁, which augments cAMP levels and inhibits cell proliferation, does not interfere with the activation of p70^{S6K} (16). Again, these results suggest that different mechanisms of p70^{S6K} activation might be operating in these cell types or in response to these receptor systems.

We also provide evidence that cAMP does not affect the induction of immediate-early genes in aortic SMC. It is interesting to note that in contrast to the results presented here, increased cAMP has been shown to down-regulate *c-myc* mRNA expression in several cell types, including normal and neoplastic B cells (19), leukemic cells (20), fibroblasts (21), and a macrophage cell line (22). The cAMP-mediated reduction in *c-myc* RNA levels results from a decrease in *c-myc* transcription (20, 22). Despite these observations, the significance of *c-myc* down-regulation is not known because constitutive expression of *c-myc* was insufficient to override the growth-inhibitory effect of cAMP in murine macrophages (22).

Accumulating evidence suggests that tyrosine phosphorylation may play a significant role in the growth response to G protein-coupled receptor agonists. Numerous studies have shown that growth factors such as thrombin, bombesin, vasopressin, endothelin, and lysophosphatidic acid stimulate tyrosine phosphorylation of multiple substrates in their target cells (36, 62, 63). The observation that selective tyrosine kinase inhibitors can block the stimulation of DNA synthesis induced by thrombin (64), endothelin (65), and bombesin (66) has provided strong evidence for the importance of this signaling pathway in the mitogenic response. Ang II was also reported to induce tyrosine phosphorylation of multiple proteins (36–40) and to stimulate the activity of cytosolic tyrosine kinases (39, 67–69) in target cells. Most importantly, treatment of aortic SMC with the tyrosine kinase inhibitors genistein and herbimycin A was found to abolish completely the stimulatory effect of Ang II on protein synthesis (40). In this study, we demonstrate that cAMP elevation interferes with tyrosine phosphorylation signaling as revealed by inhibition of Ang II-dependent tyrosine phosphorylation of the Janus kinase Tyk2 and of the focal adhesion protein paxillin. Interestingly, the effect of cAMP is selective with regard to the tyrosine kinase or the target substrate, clearly indicating that Ang II activates more than one tyrosine kinase pathway in vascular SMC. Thus, agents that raise cAMP levels may provide very useful tools to dissect the individual roles of Ang II-regulated tyrosine kinases in the induction of protein synthesis. In this regard, we are currently investigating the specific role of Janus kinases in the nuclear and cytoplasmic events controlling the rate of protein synthesis. Preliminary pharmacological data suggest that activation of the Janus kinase/Stat pathway is an essential component of Ang II hypertrophic action.³

In summary, our results reveal a functional cross-talk between tyrosine phosphorylation, and more specifically Tyk2, and the cAMP signaling system. During the course of this work, two other groups reported that activation of PKA inhibits

³ M. J. Servant and S. Meloche, unpublished results.

cytokine-dependent activation of the Janus kinase/Stat pathway in the myeloma cell line U266 (70) and in monocytes (71). Most importantly, these observations identify a novel mechanism by which cAMP may exert growth-inhibitory effects in specific cell types.

Acknowledgments—We thank Drs. F. Hall, M. Dunn, G. L'Allemain, J. Pouyssegur, L. Larose, and T. Parsons for a generous supply of antisera; E. Pérès for preparation of the figures; and I. Rémillard for secretarial assistance. We are also grateful to Dr. A. De Léan and N. McNicoll for access to the iodination and computer facilities.

REFERENCES

- Pastan, I. H., Johnson, G. S., and Anderson, W. B. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 491-522
- Boynton, A. L., and Whitfield, J. F. (1983) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**, 193-294
- Rozengurt, E. (1986) *Science* **234**, 161-166
- Dumont, J. E., Jauniaux, J. C., and Roger, P. P. (1989) *Trends Biochem. Sci.* **14**, 67-71
- Cho-Chung, Y. S. (1990) *Cancer Res.* **50**, 7093-7100
- Magnaldo, I., Pouyssegur, J., and Paris, S. (1989) *FEBS Lett.* **245**, 65-69
- Pastan, I., and Willingham, M. (1978) *Nature* **274**, 645-650
- Taylor, S. S., Buechler, J. A., and Yonemoto, W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 971-1005
- Roesler, W. J., Vandenberg, G. R., and Hanson, R. W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9063-9066
- Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17359-17362
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1993) *Science* **262**, 1065-1069
- Cook, S. J., and McCormick, F. (1993) *Science* **262**, 1069-1072
- Graves, L. M., Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Potts, B. C., MacDonald, S. G., Ross, R., and Krebs, E. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10300-10304
- Sevetson, B. R., Kong, X., and Lawrence, J. C., Jr. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10305-10309
- Burgering, B. M. T., Pronk, G. J., van Weeren, P. C., Charding, P., and Bos, J. L. (1993) *EMBO J.* **12**, 4211-4220
- Kahan, C., Seuwen, K., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13369-13375
- Monfar, M., Lemon, K. P., Grammer, T. C., Cheatham, L., Chung, J., Vlahos, C. J., and Blenis, J. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 326-337
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massagné, J., and Sherr, C. J. (1994) *Cell* **79**, 487-496
- Blomhoff, H. K., Smeland, E. B., Beiske, K., Blomhoff, R., Ruud, E., Bjoro, T., Pfeifer-Ohlsson, S., Watt, R., Funderud, S., Godal, T., and Ohlsson, R. (1987) *J. Cell. Physiol.* **131**, 426-433
- Trepel, J. B., Colamonic, O. R., Kelly, K., Schwab, G., Watt, R. A., Sausville, E. A., Jaffe, E. S., and Neckers, L. M. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2644-2648
- Heldin, N. R., Paulsson, Y., Forsberg, K., Heldin, C. H., and Westermark, B. (1989) *J. Cell. Physiol.* **138**, 17-23
- Rock, C. O., Cleveland, J. L., and Jackowski, S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2351-2358
- Baroni, M. D., Monti, P., and Alberghina, L. (1994) *Nature* **371**, 339-342
- Tokiwa, G., Tyers, M., Volpe, T., and Futcher, B. (1994) *Nature* **371**, 342-345
- Schelling, P., Fischer, H., and Ganten, D. (1991) *J. Hypertens.* **9**, 3-15
- Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M. K., Phillips, M. I., and Summers, C., eds) pp. 471-483, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- 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
- Chiu, A. T., Roscoe, W. A., McCall, D. E., and Timmermans, P. B. M. W. M. (1991) *Receptor* **1**, 133-140
- Giasson, E., and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5225-5231
- Timmermans, P. B. M. W. M., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A. M., and Smith, R. D. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**, 205-251
- Catt, K. J., Sandberg, K., and Balla, T. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M. K., Phillips, M. I., and Summers, C., eds) pp. 307-356, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- Servant, M. J., Giasson, E., and Meloche, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 16047-16052
- 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
- Force, T., Kyriakis, J. M., Avruch, J., and Bonventre, V. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6650-6656
- Huckle, W. R., Prokop, C. A., Dy, R. C., Herman, B., and Earp, S. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6290-6298
- Molloy, C. J., Taylor, D. S., and Weber, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7338-7345
- Schorb, W., Peeler, T. C., Madigan, N. N., Conrad, K. M., and Baker, K. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19626-19632
- Leduc, I., Haddad, P., Giasson, E., and Meloche, S. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**, 582-592
- Lambert, C., Massillon, Y., and Meloche, S. (1995) *Circ. Res.* **77**, 1001-1007
- Meloche, S. (1995) *J. Cell. Physiol.* **163**, 577-588
- Wang, Y., Simonson, M. S., Pouyssegur, J., and Dunn, M. J. (1992) *Biochem. J.* **287**, 589-594
- Tovey, K. C., Oldham, K. G., and Whelan, J. A. M. (1974) *Clin. Chim. Acta* **56**, 221-234
- Meloche, S., Ong, H., Cantin, M., and De Léan, A. (1986) *Mol. Pharmacol.* **30**, 537-543
- De Léan, A., Hancock, A. A., and Lefkowitz, R. J. (1982) *Mol. Pharmacol.* **21**, 5-16
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
- De Léan, A., Munson, P. J., and Rodbard, D. (1978) *Am. J. Physiol.* **235**, E97-E102
- Kawahara, Y., Sunako, M., Tsuda, T., Fukuzaki, H., Fukumoto, Y., and Takai, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 52-59
- Taubman, M. B., Berk, B. C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R. W., and Nadal-Ginard, B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 526-530
- Naftilan, A. J., Pratt, R. E., Eldridge, C. S., Lin, H. L., and Dzau, V. J. (1989) *Hypertension* **13**, 706-711
- Naftilan, A. J., Gilliland, G. K., Eldridge, C. S., and Kraft, A. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5536-5540
- Sachinidis, A., Weisser, P., Ko, Y., Schulte, K., Meyer zu Brickwedde, K., Neyse, L., and Vetter, H. (1992) *FEBS Lett.* **313**, 109-112
- Rothman, A., Wolner, B., Button, D., and Taylor, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6399-6404
- Naftilan, A. J., Pratt, R. E., and Dzau, V. J. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1419-1424
- Leduc, I., and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4401-4404
- Turner, C. E., Pietras, K. M., Taylor, D. S., and Molloy, C. J. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 333-342
- Linseman, D. A., Benjamin, C. W., and Jones, D. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12563-12568
- Wolf, G., Killen, P. D., and Neilson, E. G. (1991) *Cell Regul.* **2**, 219-227
- Wolf, G., Zahner, G., Mondorf, U., Schoeppe, W., and Stahl, R. A. K. (1993) *Nephrol. Dial. Transplant.* **8**, 128-133
- Sadoshima, J.-I., and Izumo, S. (1993) *Circ. Res.* **73**, 424-438
- Zachary, I., Gil, J., Lehmann, W., Sinnott-Smith, J., and Rozengurt, E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4577-4581
- Hordijk, P. L., Verlaan, L., van Corven, E. J., and Moolenaar, W. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 645-651
- Weiss, R. H., and Nuccitelli, R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5608-5613
- Simonson, M. S., and Herman, W. H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9347-9357
- Seckl, M., and Rozengurt, E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9548-9554
- Earp, S. S., Huckle, W. R., Dawson, T. L., Li, X., Graves, L. M., and Dy, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28440-28447
- Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerd, L., Berk, B. C., Delafontaine, P., and Bernstein, K. E. (1995) *Nature* **375**, 247-250
- Ishida, M., Marrero, M. B., Schieffer, B., Ishida, T., Berstein, K. E., and Berk, B. C. (1995) *Circ. Res.* **77**, 1053-1059
- David, M., Petricoin, E., III, and Lerner, A. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4585-4588
- Sengupta, T. K., Schmitt, E. M., and Ivashkiv, L. B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9499-9504

Résumé d'article

Differential regulation of Cdk2 activity and p27^{Kip1} expression by mitogenic and hypertrophic factors in vascular smooth muscle cells

par

Marc J. Servant et Sylvain Meloche

L'Ang II et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) sont tous deux des facteurs de croissance importants des CMLV. L'Ang II induit une hypertrophie des ces cellules sans division cellulaire alors que le PDGF-BB est un mitogène complet, induisant la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Afin d'identifier les processus moléculaires impliqués dans ces deux types de réponses (hypertrophie vs hyperplasie), nous avons examiné les effets du PDGF-BB et de l'Ang II sur les régulateurs du cycle cellulaire dans les CMLV de rat. Le traitement des CMLV au PDGF-BB ou à l'Ang II induisait tout deux une accumulation des cyclines de la phase G₁ (cyclines D1, D2, D3 et E). De plus, peu de différence était observée dans le niveau d'expression des partenaires catalytiques Cdk4 et Cdk2. Cependant, alors que ces deux facteurs de croissance induisaient une activation de l'activité Cdk4 en mi-parcours de phase G₁, seulement le PDGF-BB était capable d'induire une activation de Cdk2 en fin de phase G₁. Cette incapacité de l'Ang II d'induire une activation de Cdk2 était expliquée par le fait que ce peptide est incapable d'induire la phosphorylation sur résidu thréonine de Cdk2 et d'abaisser le niveau d'expression de p27^{Kip1}. Contrairement à l'Ang II, une exposition des CMLV au PDGF-BB résultait en une diminution progressive et importante de p27^{Kip1}. Cette diminution était associée à des réductions marquées de l'ARNm *Kip1*, de la synthèse et ainsi de la stabilité de la protéine. Notre étude démontre également que l'incapacité de l'Ang II à induire une transition en phase S n'est pas reliée à la production autocrine du TGF-β. Nos résultats suggèrent ainsi que l'expression de p27^{Kip1} est sûrement un des déterminants majeurs dans la réponse phénotypique des CMLV face à des stimuli mitogéniques ou hypertrophiques.

**Differential regulation of Cdk2 activity and p27^{Kip1}
expression by mitogenic and hypertrophic factors
in vascular smooth muscle cells**

Marc J. Servant and Sylvain Meloche

Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal and Department of
Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8

Running title: p27^{Kip1} and vascular SMC growth response

Keywords: growth factors/cell cycle/transforming growth factor- β /gene
expression/smooth muscle cells

Characters: ~60,000

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Sylvain Meloche
Research Centre
Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)
Hôtel-Dieu Pavilion
3850 St. Urbain Street
Montreal (Quebec) Canada H2W 1T8
Phone: (514) 843-2733
Fax: (514) 843-2715
E-mail: meloches@ere.umontreal.ca

Article soumis à *Journal of Cell Biology*, août 1998

ABSTRACT

Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) acts as a full mitogen for cultured aortic smooth muscle cells (SMC), promoting DNA synthesis and cell proliferation. In contrast, angiotensin II (Ang II) induces cellular hypertrophy as a result of increased protein synthesis, but is unable to drive cells into S phase. In an effort to understand the molecular basis for this differential growth response, we have examined the downstream effects of PDGF-BB and Ang II on regulators of the cell cycle machinery in rat aortic SMC. Both PDGF-BB and Ang II were found to stimulate the accumulation of G₁ cyclins with similar kinetics. In addition, little difference was observed in the expression level of their catalytic partners, Cdk4 and Cdk2. However, while both factors increased the enzymatic activity of Cdk4 in mid-G₁ phase, only PDGF-BB stimulated Cdk2 activity in late G₁ phase. The lack of activation of Cdk2 in Ang II-treated cells was causally related to the failure of Ang II to stimulate phosphorylation of the enzyme on threonine and to downregulate p27^{Kip1} expression. By contrast, exposure to PDGF-BB resulted in a progressive and dramatic reduction in the level of p27^{Kip1} protein. Notably, the lowering of p27^{Kip1} expression was associated with a marked decrease in *Kip1* mRNA accumulation, with a corresponding repression of p27^{Kip1} synthesis, and a faster turnover of the protein. We also show that the failure of Ang II to promote S phase entry is not related to the autocrine production of transforming growth factor- β 1 by aortic SMC. These results suggest that p27^{Kip1} expression is a major determinant of the phenotypic response of vascular SMC to mitogenic and hypertrophic stimuli.

INTRODUCTION

The proliferation of normal mammalian cells is controlled by an intricate network of biochemical pathways that ensure that each cell cycle event is performed correctly and in proper sequence (Murray and Hunt, 1993). Growth factor-induced signals are required for progression through the G₁ phase and must converge, in late G₁, on the cell cycle engine to ensure the commitment of cells to enter S phase (Pardee, 1989). The regulation of G₁ progression and G₁/S transition is governed, at least in part, by the concerted action of cyclin-dependent kinases (Cdks) and their regulatory cyclin subunits (Draetta, 1994; Sherr, 1994; Grana and Reddy, 1995). When quiescent cells resume cycling in response to growth factors, D-type cyclins (D1, D2 and D3) progressively accumulate during G₁ phase and assemble with their catalytic partners Cdk4 and Cdk6. The activity of Cdk4/Cdk6 is first detected in mid-G₁ and increases as cells approach the G₁/S boundary. One major target of Cdk4/Cdk6 is the retinoblastoma protein (pRb), which upon phosphorylation dissociates from bound transcription factors, such as E2F, enabling them to activate genes required for DNA replication (Weinberg, 1995). Cyclin E is expressed at maximum level in late G₁ and associates with Cdk2. Biochemical and genetic data indicate that cyclin E-Cdk2 activity is essential for entry into S phase (van den Heuvel and Harlow, 1993; Knoblich et al., 1994; Ohtsubo et al., 1995; Krude et al., 1997).

The activity of Cdks is regulated by a combination of mechanisms. These include the synthesis of the cyclin and Cdk, the assembly of these proteins into complexes, the phosphorylation of a conserved threonine residue by Cdk-activating kinase (CAK), and the interaction with Cdk inhibitory proteins (Morgan, 1995). Cdk inhibitors fall into two gene families (Sherr and Roberts, 1995). The Ink4 family of proteins which includes p16^{Ink4A}, p15^{Ink4B}, p18^{Ink4C} and p19^{Ink4D}, specifically interact with Cdk4 and Cdk6 to prevent cyclin D-Cdk assembly or enters into stable

ternary complexes with cyclin D-Cdk resulting in complexes that are catalytically inactive (Serrano et al., 1993; Guan et al., 1994; Hannon and Beach, 1994; Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995). The second family of inhibitors includes p21^{Cip1/Waf1} (El-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993; Noda et al., 1994), p27^{Kip1} (Polyak et al., 1994a; Toyoshima and Hunter, 1994) and p57^{Kip2} (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995), which are all structurally unrelated to the Ink4 proteins. The Cip/kip family binds to and inhibits a broader range of Cdks than the Ink4 family and displays a preference for fully assembled cyclin-Cdk complexes. They inhibit the kinase activity of G₁ Cdks by stoichiometric binding to the cyclin-Cdk complex or by physically blocking the phosphorylation of the Cdk subunit by CAK (Sherr and Roberts, 1995). Among them, p27^{Kip1} was first identified in transforming growth factor β (TGF- β)-treated cells (Polyak et al., 1994b; Slingerland et al., 1994). The expression of p27^{Kip1} is increased in serum-starved or density-arrested cells (Firpo et al., 1994; Kato et al., 1994; Nourse et al., 1994) and in cells exposed to anti-proliferative signals like transforming growth factor- β (TGF- β), rapamycin (Nourse et al., 1994) and cAMP (Kato et al., 1994; L'Allemain et al., 1997). In contrast, the level of p27^{Kip1} declines in response to mitogenic factor stimulation (Kato et al., 1994; Nourse et al., 1994; Coats et al., 1996; Winston et al., 1996; this study). Thus, in addition to D-type cyclins, p27^{Kip1} may play an essential role in connecting mitogenic signaling pathways to cell cycle activation. Ectopic expression of p27^{Kip1} causes cell cycle arrest in G₁ phase (Polyak et al., 1994a; Toyoshima and Hunter, 1994) and, conversely, antisense inhibition of p27^{Kip1} expression suppresses quiescence in fibroblasts (Coats et al., 1996; Rivard et al., 1996).

In cultured arterial smooth muscle cells (SMC), the peptide growth factor platelet-derived growth factor (PDGF)-BB acts as a full mitogen, promoting DNA synthesis and cell division (Raines et al., 1990; Grainger et al., 1994). The mitogenic action of PDGF-BB is initiated by its interaction with two structurally related tyrosine

kinase receptors which dimerize upon ligand binding, leading to activation of the intrinsic kinase domain and intermolecular autophosphorylation (Claesson-Welsh, 1994). The phosphorylated tyrosine residues serve as docking sites for multiple SH2-containing signaling molecules that include Src, phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase), phospholipase C- γ (PLC- γ), SHP-2, Grb2, Shc, and Nck. Recruitment and activation of these effector proteins catalyze the formation of second messengers and propagate the signal to downstream serine/threonine kinases, such as protein kinase C, mitogen-activated protein (MAP) kinases and p70 S6 kinase, ultimately resulting in increased gene expression and DNA synthesis (Claesson-Welsh, 1994; Heldin, 1997).

In contrast to PDGF-BB, many investigators, including ourselves, have shown that the peptide angiotensin II (Ang II) induces cellular hypertrophy in cultured aortic SMC as a result of increased protein synthesis, but is unable to drive cells into S phase (Geisterfer et al., 1988; Berk et al., 1989; Chiu et al., 1991; Grainger et al., 1994; Giasson and Meloche, 1995). On the other hand, Ang II was reported to exert weak mitogenic effects on SMC of resistance arteries (Dubey et al., 1992) and on aortic SMC isolated from spontaneously hypertensive rats (Bunkenburg et al., 1992; Itazaki et al., 1995). *In vivo*, a number of studies have shown that infusion of Ang II stimulates SMC DNA synthesis and proliferation in normal and injured rat arteries (Daemen et al., 1991; van Kleef et al., 1992; deBlois et al., 1996; Su et al., 1998). However, results of *in vivo* studies are difficult to interpret since the effect of Ang II may be indirect or Ang II may simply act as a co-mitogen. It has been postulated that Ang II may be a bifunctional growth factor that activates both proliferative and antiproliferative (TGF- β 1) signals in vascular SMC (Gibbons et al., 1992; Koibuchi et al., 1993). According to this model, the autocrine production of TGF- β 1 would determine whether vascular SMC grow by hypertrophy or hyperplasia in response to Ang II.

In cultured aortic SMC, the hypertrophic action of Ang II is initiated by its interaction with the G protein-coupled AT₁ receptor, which stimulates the activity of

PLC- β to generate the second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) and diacylglycerol, and inhibits the activity of adenylyl cyclase (Catt et al., 1993; Timmermans et al., 1993). These early signaling events subsequently lead to the activation of multiple serine/threonine kinases which include the MAP kinases ERK1/ERK2 (Duff et al., 1992; Tsuda et al., 1992; Servant et al., 1996) and p70 S6 kinase (Giasson and Meloche, 1995). Ang II also induces tyrosine phosphorylation of multiple proteins in aortic SMC (Molloy et al., 1993; Leduc et al., 1995) and stimulates the activity of cytosolic tyrosine kinases such as p125^{FAK} (Polte et al., 1994; Giasson et al., 1997), Pyk2 (Giasson et al., 1997), Src (Ishida et al., 1995), and the Janus kinases Jak2 and Tyk2 (Marrero et al., 1995; Giasson et al., 1997). Despite the fact that Ang II and PDGF-BB activate similar signal transduction pathways, only the latter is able to induce proliferation of aortic SMC.

In an effort to understand the molecular basis for this differential response, we have examined the downstream effects of PDGF-BB and Ang II on regulators of the cell cycle machinery. We show that while both factors are able to stimulate the activity of Cdk4 in mid-G₁, only PDGF-BB increases the enzymatic activity of Cdk2 in late G₁ phase. The lack of activation of Cdk2 in Ang II-treated cells is associated with the failure of Ang II to downregulate p27^{Kip1} expression. We also demonstrate that the inability of Ang II to promote S phase entry is not due to autocrine production of TGF- β 1 by aortic SMC. Our results identify p27^{Kip1} as a major determinant of the phenotypic response of vascular SMC following exposure to mitogenic or hypertrophic factors.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Rat aortic SMC were cultured to 80 % confluence and synchronized in the quiescent state as described previously (Giasson and Meloche, 1995). The cells were stimulated with 100 nM Ang II (Hukabel Scientific) or 50 ng/ml PDGF-BB (Oncogene Science) for the indicated times at 37°C. Cultures of neonatal rat cardiac fibroblasts were kindly provided by Drs. Mona Nemer and Angelo Corderone (University of Montreal) and were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Cardiac fibroblasts were synchronized using the same medium and conditions as described for aortic SMC. Mv1Lu mink lung epithelial cells (obtained from Dr. Maureen O'Connor, Biotechnology Research Institute of Montreal) were grown in minimal essential medium containing 10% fetal bovine serum.

Protein synthesis, DNA synthesis and cell number measurements

For protein synthesis measurements, quiescent aortic SMC in 6-well plates were stimulated with Ang II or PDGF-BB for 72 h in serum-free medium containing 0.5 μ Ci/ml [³H]leucine. For DNA synthesis measurements, quiescent aortic SMC in 35-mm Petri dishes or cardiac fibroblasts in 24-well plates were stimulated for the indicated times with Ang II or PDGF-BB and pulse-labeled with 2 μ Ci/ml [³H]thymidine for the last 2 to 4 h. After the stimulation, the medium was aspirated and the cells were incubated for a minimum of 30 min in cold 5% trichloroacetic acid (TCA). The wells were then washed once with TCA and three times with tap water. The radioactivity incorporated into TCA-precipitable material was measured by liquid scintillation counting after solubilization in 0.1 M NaOH. For determination of cell number, quiescent aortic SMC in 6-well plates were stimulated with Ang II or PDGF-BB for 72 h and then were trypsinized and counted using a hemacytometer.

Immunoblot analysis

Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10^{-4} M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10^{-6} M leupeptin, 10^{-6} M pepstatin A, 1% Triton X-100) for 30 min at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 13,000 x g for 10 min and equal amounts of lysate proteins (30-85 μ g) were subjected to electrophoresis on 12 or 15% acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine and fixed for 10 min in methanol/acetic acid/glycerol (40:7:3). The membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20 for 1 h at 37°C prior to incubation for 1 h at 25°C with 2 μ g/ml of monoclonal antibody (mAb) to cyclin D1(DCS-6), cyclin D2 (DCS-3.1) or cyclin D3 (DCS-22) (NeoMarkers), or 1 μ g/ml of polyclonal antibody to cyclin E (SC-481), Cdk2 (SC-163), Cdk4 (SC-260) or p27^{Kip1} (SC-528) (Santa Cruz Biotechnology) in blocking solution. After washing four times in TBS, 0.1% Tween 20, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:10,000) in blocking solution. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham).

Protein kinase assays

The phosphotransferase activity of Cdk2 was measured by immune complex kinase assay using histone H1 as substrate as described previously (Meloche, 1995). Briefly, lysate proteins (200 μ g) were subjected to immunoprecipitation with 1 μ g of anti-Cdk2 antibody preadsorbed to protein A-Sepharose beads for 2 h at 4°C. The immune complexes were washed three times with Triton X-100 lysis buffer and once with kinase assay buffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol).

Histone H1 kinase activity was assayed by resuspending the beads in a total volume of 40 μ l of kinase assay buffer containing 0.25 mg/ml histone H1 (Boehringer Mannheim), 100 μ M ATP, and 10 μ Ci [γ - 32 P]ATP. The reactions were initiated by the addition of ATP, incubated at 30°C for 5 min, and stopped by addition of 2X denaturing sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis and the band corresponding to histone H1 was excised and counted.

For inhibition experiments, extracts of PDGF-BB-stimulated cells containing active Cdk2 were mixed with boiled (5 min at 100°C) extracts of Ang II-stimulated cells (1:1 ratio; 200 μ g protein of each lysate) for 1.5 h at 4°C prior to immunoprecipitation of Cdk2 and kinase assay. Immunodepletion of p27^{Kip1} was performed by incubating 200 μ g of Ang II-treated cell extract with 5 μ g of anti-p27^{Kip1} antibody for 2 h at 4°C. The resulting supernatant was then used for the inhibition experiment. Specificity of p27^{Kip1} immunodepletion was assessed by preincubating the anti-p27^{Kip1} antibody with excess immunogenic peptide (50 μ g of SC-528P from Santa-Cruz Biotechnology) for 2 h at 4°C before incubation with Ang II-treated cell extract.

Cdk4 enzymatic assays were performed essentially as described (Matsushime et al., 1994) with some modifications. After stimulation, the cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in Tween 20 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 20 mM β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10⁻⁴ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A, and 0.1% Tween 20). The cells were scraped from the plates and sonicated at 4°C (once for 10 sec). Cellular lysates were clarified by centrifugation and 150 μ g of lysate proteins were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and then incubated for 3 h at 4°C with 1 μ g of anti-Cdk4 antibody preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immune complexes were washed twice with Tween 20 lysis buffer and twice with kinase assay buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 10 mM β -glycerophosphate, 1

mM sodium fluoride, and 0.1 mM sodium orthovanadate). pRb kinase activity was assayed by resuspending the beads in a total volume of 40 μ l of kinase assay buffer containing 1 μ g glutathione S-transferase (GST)-pRb protein (amino acids 792 to 928), 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 20 μ M ATP, and 10 μ Ci [γ - 32 P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 30 min and stopped by addition of 2X denaturing sample buffer. The samples were resolved by SDS-gel electrophoresis and the radioactivity incorporated into GST-pRb was counted.

The recombinant GST-pRb protein was expressed in *Escherichia coli* by transformation with plasmid pGEX-Rb (obtained from Dr. Jacques Pouyssegur) and purified as described (Matsushime et al., 1994).

32 P labeling and immunoprecipitation

Quiescent aortic SMC in 100-mm Petri dishes were stimulated for 20 h with Ang II or PDGF-BB and labeled for the last 5 h in bicarbonate and phosphate-free HEPES-buffered MEM containing 0.5 mCi/ml [32 P]phosphoric acid. The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer. After clarification, the lysates were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and Cdk2 was immunoprecipitated as described above. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels. The proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol and visualized by autoradiography.

Phosphoamino acid analysis

The labeled band corresponding to Cdk2 was excised from the PVDF membrane and subjected to partial acid hydrolysis in 5.7 M HCl for 1 h at 110°C

Histone H1 kinase activity was assayed by resuspending the beads in a total volume of 40 μ l of kinase assay buffer containing 0.25 mg/ml histone H1 (Boehringer Mannheim), 100 μ M ATP, and 10 μ Ci [γ - 32 P]ATP. The reactions were initiated by the addition of ATP, incubated at 30°C for 5 min, and stopped by addition of 2X denaturing sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis and the band corresponding to histone H1 was excised and counted.

For inhibition experiments, extracts of PDGF-BB-stimulated cells containing active Cdk2 were mixed with boiled (5 min at 100°C) extracts of Ang II-stimulated cells (1:1 ratio; 200 μ g protein of each lysate) for 1.5 h at 4°C prior to immunoprecipitation of Cdk2 and kinase assay. Immunodepletion of p27^{Kip1} was performed by incubating 200 μ g of Ang II-treated cell extract with 5 μ g of anti-p27^{Kip1} antibody for 2 h at 4°C. The resulting supernatant was then used for the inhibition experiment. Specificity of p27^{Kip1} immunodepletion was assessed by preincubating the anti-p27^{Kip1} antibody with excess immunogenic peptide (50 μ g of SC-528P from Santa-Cruz Biotechnology) for 2 h at 4°C before incubation with Ang II-treated cell extract.

Cdk4 enzymatic assays were performed essentially as described (Matsushime et al., 1994) with some modifications. After stimulation, the cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in Tween 20 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 20 mM β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10⁻⁴ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10⁻⁶ M leupeptin, 10⁻⁶ M pepstatin A, and 0.1% Tween 20). The cells were scraped from the plates and sonicated at 4°C (once for 10 sec). Cellular lysates were clarified by centrifugation and 150 μ g of lysate proteins were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and then incubated for 3 h at 4°C with 1 μ g of anti-Cdk4 antibody preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immune complexes were washed twice with Tween 20 lysis buffer and twice with kinase assay buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 10 mM β -glycerophosphate, 1

mM sodium fluoride, and 0.1 mM sodium orthovanadate). pRb kinase activity was assayed by resuspending the beads in a total volume of 40 μ l of kinase assay buffer containing 1 μ g glutathione S-transferase (GST)-pRb protein (amino acids 792 to 928), 0.2 mg/ml bovine serum albumin, 20 μ M ATP, and 10 μ Ci [γ - 32 P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 30 min and stopped by addition of 2X denaturing sample buffer. The samples were resolved by SDS-gel electrophoresis and the radioactivity incorporated into GST-pRb was counted.

The recombinant GST-pRb protein was expressed in *Escherichia coli* by transformation with plasmid pGEX-Rb (obtained from Dr. Jacques Pouyssegur) and purified as described (Matsushime et al., 1994).

32 P labeling and immunoprecipitation

Quiescent aortic SMC in 100-mm Petri dishes were stimulated for 20 h with Ang II or PDGF-BB and labeled for the last 5 h in bicarbonate and phosphate-free HEPES-buffered MEM containing 0.5 mCi/ml [32 P]phosphoric acid. The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer. After clarification, the lysates were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and Cdk2 was immunoprecipitated as described above. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels. The proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol and visualized by autoradiography.

Phosphoamino acid analysis

The labeled band corresponding to Cdk2 was excised from the PVDF membrane and subjected to partial acid hydrolysis in 5.7 M HCl for 1 h at 110°C

(Kamps, 1991). The resulting phosphoamino acids along with unlabeled phosphoamino acid standards (0.2 mg/ml) were separated by one-dimensional thin layer electrophoresis using an optimized pH 2.5 buffer (Jelinek and Weber, 1993). The standards were visualized by ninhydrin staining and the labeled amino acids by autoradiography.

Biosynthetic labeling experiments and immunoprecipitation

To examine the turnover of p27^{Kip1} protein, quiescent aortic SMC in 100-mm Petri dishes were pulse labeled for 1 h with 50 μ ci/ml of [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine and then chased for the indicated times in serum-free medium containing excess methionine and cysteine and either Ang II or PDGF-BB. The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer. Lysates (500 μ g proteins) were precleared for 1 h with 5 μ l of normal rabbit serum and the resulting supernatants were incubated with protein A-Sepharose beads preadsorbed with 1 μ g of anti-p27^{Kip1} for 4 h at 4°C. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels. The p27^{Kip1} protein was detected by fluorography and quantified using a PhosphorImager apparatus.

For labeling newly synthesized proteins, cells were stimulated for the indicated times, rinsed with methionine and cysteine-free medium, and incubated with 75 μ Ci/ml of [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine. Labeling was allowed to proceed for the last 1 h. Cell lysis and immunoprecipitation of p27^{Kip1} were conducted as described above.

Northern blot analysis

Total RNA was extracted by a modified version of the guanidinium thiocyanate procedure as described (Chomczynski and Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Equal

amounts of total RNA (15-25 μg) were denatured and resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel containing 1.8% formaldehyde. The RNA were transferred to Hybond-N membranes (Amersham), fixed, and hybridized with ^{32}P -labeled probes. Hybridization was carried out in hybridization medium [5 x SSC (1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 0.1% SDS, 5 x Denhardt's solution (1 x Denhardt's = 0.02% Ficoll 400, 0.02% polyvinyl pyrrolidone and 0.02% bovine serum albumin), 50% formamide, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ herring sperm DNA] containing the labeled probe (1-2 x 10^6 cpm/ml) for 16 h at 42°C. The membranes were washed twice at 25°C for 15 min in 2 x SSC, 0.1% SDS, and twice at 60°C for 30 min in 0.5 X SSC, 0.1% SDS. The extent of hybridization was analyzed with a PhosphorImager apparatus. The results were normalized to 18S ribosomal RNA.

The probes used were: a 1.5 kb EcoRI fragment of human p27^{Kip1} cDNA (provided by Dr. Joan Massagué, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) and a DNA oligonucleotide derived from the rat 18S ribosomal RNA sequence.

TGF- β 1 bioassay

TGF- β 1 bioassay was conducted essentially as described previously (Gibbons et al., 1992). Recombinant TGF- β 1 and TGF- β 1 neutralizing antibody (TNA) were generous gifts from Dr. Maureen O'Connor. Briefly, Mv1Lu cells were plated at a density of 5 x 10^5 cells per well in 24-well plates. After 6 h of serum exposure, the cells were washed with serum-free medium, then incubated with conditioned medium or TGF- β 1 in serum-free medium for 24 h. The rate of DNA synthesis was measured by pulse labeling cells with 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^3H]thymidine during the last 6 h of incubation. For each experiment, a standard curve was constructed with increasing concentrations of recombinant TGF- β 1. Ang II conditioned medium was obtained from aortic SMC stimulated for 24 h with Ang II and was added to Mv1Lu cells at two dilutions (1:5 and 1:10).

TGF- β 1 neutralizing antibody was purified by protein A-agarose chromatography. The antibody was used at a concentration of 10-15 μ g/ml, which completely block the growth inhibitory effect of TGF- β 1 in Mv1Lu cells.

RESULTS

PDGF-BB but not Ang II induces DNA synthesis in aortic SMC

We compared the ability of the vascular growth factors PDGF-BB and Ang II to stimulate the rate of DNA synthesis in quiescent rat aortic SMC. As previously reported (Geisterfer et al., 1988; Berk et al., 1989; Chiu et al., 1991; Giasson et al., 1995), treatment of aortic SMC with Ang II had no significant effect on DNA synthesis as measured by [³H]thymidine incorporation (Figure 1A). In contrast, addition of PDGF-BB strongly increased the rate of DNA synthesis which reached a peak (180-fold over basal level) at 24 h after stimulation. PDGF-BB also induced cellular division as reflected by an increase in SMC number and by the small ratio between [³H]leucine incorporation and cell number (Figure 1B). Ang II did not promote cell division but caused cellular hypertrophy by increasing the rate of protein synthesis per cell over a period of 72 h (Figure 1B). This finding suggests that cell cycle progression is not delayed in Ang II-stimulated cells, but rather that cells are arrested in G₁ phase. Thus, PDGF-BB is a strong mitogenic factor for rat aortic SMC promoting DNA synthesis and cellular division, whereas Ang II acts as an hypertrophic factor.

Ang II fails to stimulate the activity of Cdk2 in aortic SMC

In an effort to understand the molecular basis for this differential response of aortic SMC to vascular growth factors, we examined the downstream effects of PDGF-BB and Ang II on regulators of the cell cycle machinery. We first analyzed the regulated expression of G₁ cyclins. Figure 2A shows that both PDGF-BB and Ang II stimulated the accumulation of D-type cyclins with similar kinetics. The expression of cyclin D1, D2 and D3 was already increased at 4 h post-stimulation and reached a maximal level by 12 to 16 h. We also observed a weak but significant induction of cyclin E expression, which was delayed as compared with D-type cyclins, beginning at 8 to 12

h post-stimulation and reaching a maximum at 16 to 20 h (Figure 2A). It should be noted that PDGF-BB promoted higher levels of cyclin D1 accumulation than Ang II in aortic SMC. This is in agreement with previous observations showing that the extent of cyclin D1 accumulation is correlated with the mitogenic potential of growth factors and their ability to induce sustained ERK1/ERK2 activation (Lavoie et al., 1996; and data not shown). Little difference was observed in the expression level of the catalytic subunits Cdk4 and Cdk2, which were present in all extracts, including those prepared from quiescent cells (Figure 2B). However, we noted that treatment with PDGF-BB results in the late appearance of a faster migrating species of Cdk2, which is indicative of phosphorylation of the enzyme on threonine 160 (Gu et al., 1992). Only the slower migrating form of Cdk2 was observed in Ang II-stimulated cells.

We next measured the enzymatic activity of Cdk4 and Cdk2 following treatment of aortic SMC with the two vascular growth factors. Cdk4 and Cdk2 were selectively immunoprecipitated from cell lysates and their activity assayed *in vitro* using GST-pRb fusion protein and histone H1 as substrates, respectively. As seen in Figure 3A, both Ang II and PDGF-BB increased the Rb kinase activity of Cdk4, which became detectable near mid-G₁ and remained elevated up to the end of G₁ phase. Notably, Ang II treatment of aortic SMC induced a delayed Rb kinase activity as compared to PDGF-BB treatment. These results most likely reflect the quantitative differences in the ability of Ang II and PDGF-BB to regulate the expression of cyclin D1 (Figure 2A). Both factors equally stimulated Cdk4 activity after 16 h of exposure. As expected, stimulation of aortic SMC with the mitogenic factor PDGF-BB strongly increased Cdk2-associated histone H1 kinase activity, which was first detected at 12 h and reached a maximum in S phase (Figure 3B). In contrast, treatment with Ang II failed to induce any detectable Cdk2 activity over the same period of time, despite the significant expression of cyclin E in late G₁ phase (see Figure 2A). We thus carried out a series of experiments to explain the inability of Ang II to activate Cdk2. Since CAK-mediated

phosphorylation of threonine 160 on Cdk2 is required for kinase activation (Morgan, 1995), we first analyzed the phosphorylation state of Cdk2 after immunoprecipitation from ^{32}P -labelled cells stimulated with Ang II or PDGF-BB. Figure 4 shows that the lack of activation of Cdk2 in Ang II-treated cells was associated with the failure of Ang II to stimulate phosphorylation of the enzyme on threonine. On the other hand, addition of PDGF-BB resulted in the phosphorylation of Cdk2 on both threonine, tyrosine and serine residues (Figure 4B). Indeed, it has been previously reported in HeLa cells that most of the phosphorylation of Cdk2 on tyrosine (tyrosine 15) occurs on Cdk2 molecules that are also phosphorylated on threonine 160 (Gu et al., 1992). The absence of CAK-mediated threonine phosphorylation of Cdk2 in Ang II-treated cells was not attributable to the inability of Cdk2 to form complexes with cyclin E. Immunoblot analysis revealed that cyclin E immunoprecipitates isolated from cells treated for 20 h with Ang II or PDGF-BB contain a similar amount of Cdk2 protein (Figure 4C). Thus, these results indicate that mechanisms other than cyclin E expression or cyclin E-Cdk2 complex assembly account for the inability of Ang II to induce threonine 160 phosphorylation of Cdk2 and to stimulate the activity of the enzyme in aortic SMC.

Differential modulation of p27^{Kip1} expression by PDGF-BB and Ang II

In addition to its ability to disrupt the catalytic activity of phosphorylated cyclin-bound Cdks (Russo et al., 1996), the inhibitor p27^{Kip1} can also sterically interfere with the phosphorylation of Cdks by CAK (Kato et al., 1994; Polyak et al., 1994a; Aprelikova et al., 1995). To determine whether p27^{Kip1} was a determinant factor in the differential regulation of Cdk2 activation by mitogenic and hypertrophic factors, we compared the levels of p27^{Kip1} protein expression. The expression of p27^{Kip1} protein was elevated in quiescent aortic SMC and decreased progressively upon treatment of cells with the mitogenic factor PDGF-BB (Figure 5A). The decrease in p27^{Kip1} level was already evident at 4 h after PDGF-BB exposure. After 20 h of stimulation with PDGF-BB, the

expression of p27^{Kip1} was reduced by ~80%. In contrast, Ang II had a negligible effect on the expression of the Cdk inhibitory protein. Importantly, we found that mixing of boiled extract from Ang II-stimulated cells with an equal amount of extract from cells treated for 20 h with PDGF-BB significantly reduced Cdk2-associated histone H1 kinase activity (Figure 5B). p27^{Kip1} has been previously shown to be heat-stable (Polyak et al., 1994b), thus making it a good candidate for the inhibitory factor of Ang II-boiled extracts. Indeed, the Cdk2 inhibitory activity present in Ang II-treated cells was completely eliminated after immunodepletion of p27^{Kip1} with a specific antibody (Figure 5B). Preincubation of the anti-p27^{Kip1} antibody with a saturating amount of immunogenic peptide completely restored the Cdk2 inhibitory activity, confirming that p27^{Kip1} is the major factor responsible for this activity. Addition of boiled extracts from PDGF-BB-stimulated cells, which contain very low level of p27^{Kip1} (Figure 5A), did not inhibit Cdk2 activity of extracts from cells exposed to PDGF-BB for 20 h (data not shown).

The inability of Ang II to downregulate expression of p27^{Kip1} in aortic SMC was also reflected by the increased association of the inhibitor with cyclin E-Cdk2 complexes. When cells exposed to Ang II or PDGF-BB were subjected to immunoprecipitation with anti-p27^{Kip1} antibody, the level of cyclin E was significantly reduced in the supernatant of Ang II-treated cells, as compared to PDGF-BB-stimulated cells (Figure 5C). This correlated with the higher amount of p27^{Kip1} present in the immunoprecipitates from Ang II-treated cells (Figure 5C) and in whole cell lysates (Figure 5A). From these results, we conclude that the failure of Ang II to downregulate p27^{Kip1} expression is responsible, at least in part, for the inability of Ang II to induce Cdk2 activation, DNA synthesis and cellular division in aortic SMC.

The abundance of p27^{Kip1} is regulated both at the level of mRNA expression and protein stability in aortic SMC

We next addressed the question of how the levels of p27^{Kip1} are regulated by vascular growth factors. Studies in other cell systems have shown that the abundance of p27^{Kip1} is controlled by its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway (Pagano et al., 1995) and by changes of its rate of synthesis (Agrawal et al., 1996; Hengst and Reed, 1996; Takuwa and Takuwa, 1997). To determine the rate of p27^{Kip1} turnover, pulse-chase experiments were conducted on aortic SMC treated with Ang II or PDGF-BB. No difference in the rate of degradation of p27^{Kip1} was observed up to 8 h after growth factor addition (Figure 6A and 6B and data not shown). However, after this period, the turnover rate of the inhibitor was clearly faster in cells exposed to PDGF-BB. This difference in p27^{Kip1} stability temporally coincided with the apparition of the active phosphorylated form of Cdk2 in PDGF-BB-treated cells (see Figure 2B).

The rate of synthesis of p27^{Kip1} was also affected by treatment with vascular growth factors. As shown in Figure 6C, the synthesis of p27^{Kip1} was already dramatically repressed after 2 h of PDGF-BB stimulation and this inhibition persisted for up to 12 h, whereas the reduction was much less significant in cells treated with Ang II. The repression of p27^{Kip1} synthesis was transient and the rate of synthesis reincreased at 12 h. To verify whether the decline in p27^{Kip1} synthesis was associated with a decrease in *Kip1* mRNA accumulation, we measured the steady-state levels of *Kip1* mRNA by Northern hybridization. Results of these experiments clearly revealed that expression of *Kip1* mRNA is regulated in aortic SMC. PDGF-BB treatment resulted in a rapid and marked decrease of *Kip1* mRNA which was almost undetectable by 2 h of stimulation and then slowly returned to its quiescent level at ~12 h (Figure 7). Ang II also reduced expression of *Kip1* mRNA, but the effect was much smaller in comparison to PDGF-BB. The time course of *Kip1* mRNA downregulation and reappearance correlated well with the transient decrease in the rate of p27^{Kip1} synthesis

seen after PDGF-BB and Ang II treatment (Figure 6C). This suggests that repression of p27^{Kip1} synthesis by vascular growth factors is likely attributable to a corresponding decrease of *Kip1* mRNA abundance.

The failure of Ang II to promote S phase entry of aortic SMC is not explained by autocrine production of TGF-β1

TGF-β1 is the prototype of a family of growth factors that play important roles in cellular growth, differentiation and morphogenesis (Massague, 1990). In particular, TGF-β1 is a potent growth inhibitor for many cell types, including vascular SMC (Owens et al., 1988). Several mechanisms have been proposed to explain how TGF-β1 inhibits proliferation and induces cell cycle arrest in G₁ phase (Hannon and Beach, 1994; Reynisdottir et al., 1995). The observation that Ang II can induce hypertrophic or mitogenic effects in vascular SMC had led to the hypothesis that Ang II activates both proliferative and antiproliferative, specifically TGF-β1, signals (Gibbons et al., 1992). We therefore carried out a series of experiments to test the possibility that autocrine production of TGF-β1 may be responsible for the failure of Ang II to activate Cdk2 and induce DNA synthesis in aortic SMC. To determine whether Ang II stimulates the production of active TGF-β1, we used a highly sensitive bioassay which is based on the ability of TGF-β to induce G₁ arrest in Mv1Lu cells. Figure 8A shows that addition of 10 pM TGF-β1 to Mv1Lu cells is sufficient to inhibit DNA synthesis by 90%. This inhibitory activity of TGF-β1 is reversed by co-incubation with TGF-β1 neutralizing antibody but not with normal rabbit IgG. However, conditioned medium from Ang II-treated aortic SMC did not inhibit Mv1Lu cells DNA synthesis, but rather had a significant stimulatory effect (Figure 8B). We also tested the effect of TGF-β1 neutralizing antibody on the ability of Ang II to stimulate DNA synthesis in aortic SMC. Co-incubation of Ang II with normal rabbit IgG or TGF-β1 neutralizing antibody had essentially no effect on the rate of DNA synthesis (Figure 8C). Finally,

we examined the effect of simultaneous exposure of aortic SMC to both PDGF-BB and Ang II. Simultaneous addition of Ang II or pre-treatment with Ang II (data not shown) did not interfere with PDGF-BB-induced DNA synthesis, consistent with the idea that Ang II does not stimulate the synthesis of an antimitogenic factor (Figure 8C). Together, these results demonstrate that the failure of Ang II to promote S phase entry of aortic SMC is not due to autocrine production of TGF- β 1.

The mitogenic effect of Ang II in cardiac fibroblasts is associated with a reduction in the expression of p27^{Kip1}

Ang II has been shown to have weak mitogenic effects on neonatal rat cardiac fibroblasts (Sadoshima and Izumo, 1993; Schorb et al., 1993). On the basis of this observation, we predicted that Ang II should downregulate the expression of p27^{Kip1} in cardiac fibroblasts. Figure 9 shows that this was the case. Stimulation of cardiac fibroblasts for 24 h with Ang II increased the rate of DNA synthesis by 100 % (Figure 9A), a result comparable to previous studies (Sadoshima and Izumo, 1993; Schorb et al., 1993). Most importantly, Ang II induced a significant time-dependent downregulation of p27^{Kip1} expression in these cells (Figure 9B).

DISCUSSION

Unlike cardiac and skeletal muscle cells, which undergo terminal and irreversible differentiation, vascular SMC display remarkable cellular plasticity which allows them to acquire a spectrum of different phenotypes in response to appropriate stimuli (Owens, 1995). In addition to their main function of contraction, vascular SMC can increase their mass through cellular proliferation, cellular hypertrophy and production of extracellular matrix proteins. Changes in growth rates occur normally during development of the vascular system and after vascular injury, but also under pathological conditions such as hypertension and atherosclerosis (Schwartz et al., 1986; Owens, 1989; Ross, 1993). In animal models of hypertension, the increase in vascular mass is associated primarily with SMC hypertrophy in large arteries and with hyperplasia in small resistance vessels. SMC proliferation also plays a central role in the atherosclerotic process. The growth response of vascular SMC is clearly dependent on the nature of the growth stimulus. For example, in cultured rat aortic SMC, agonists like Ang II induce cellular hypertrophy as a result of increased protein synthesis (Geisterfer et al., 1988; Berk et al., 1989; Chiu et al., 1991; Grainger et al., 1994; Giasson and Meloche, 1995), whereas peptide growth factors like PDGF-BB cause a strong proliferative response (Raines et al., 1990; Grainger et al., 1994). However, much remain to be learned about the molecular determinants of vascular SMC hypertrophic versus hyperplastic growth response. Here, we present strong evidence that p27^{Kip1} is a major determinant of the phenotypic response of vascular SMC. First, we show that treatment with the mitogenic factor PDGF-BB, but not with the hypertrophic factor Ang II, leads to a progressive and dramatic decline in the level of p27^{Kip1} protein. The failure of Ang II to downregulate p27^{Kip1} contributes to the increased association of the inhibitor with cyclin E-Cdk2 complexes and correlates with inhibition of threonine 160 phosphorylation of Cdk2. Since CAK activity does not

appear to change during the cell cycle (Sclafani et al., 1996), the simplest interpretation of our data is that stoichiometric binding of p27^{Kip1} to cyclin E-Cdk2 complexes prevents CAK from phosphorylating and activating Cdk2 in Ang II-treated cells. In support of this hypothesis, *in vitro* studies have shown that p27^{Kip1} binding to preformed cyclin E-Cdk2 complexes blocks CAK-mediated threonine 160 phosphorylation of the enzyme (Polyak et al., 1994a; Aprelikova et al., 1995). Second, we further show that extracts from Ang II-stimulated cells contain enough CDK inhibitory activity to reduce by ~ 70% Cdk2-associated histone H1 kinase activity of PDGF-BB-treated cell extracts. The stability of this inhibitory activity to heat treatment and its reversal following immunodepletion of p27^{Kip1} revealed that p27^{Kip1} is the major inhibitory factor present in these extracts. Finally, we show that in cardiac fibroblasts, where Ang II has mitogenic effects (Sadoshima and Izumo, 1993; Schorb et al., 1993), the ability of the hormone to induce DNA synthesis is associated with a progressive decline in the level of p27^{Kip1} protein.

The abundance of p27^{Kip1} protein is regulated by multiple mechanisms in vascular SMC. Our data support a model where the reduction of p27^{Kip1} expression observed in response to mitogenic factors occurs in two steps. The first step is a rapid decrease in the rate of synthesis which becomes minimal by 2 h and remains inhibited up to 12 h after stimulation. This lowered synthesis combined with the significant turnover of the protein (see Figure 6B, from 0 to 8 h) would be responsible for the initial decline in p27^{Kip1} protein levels, which can be easily detected by 4 h of PDGF-BB stimulation (see Figure 5A). Interestingly, kinetic analysis reveal that the transient reduction in the rate of p27^{Kip1} synthesis is tightly paralleled by a transient downregulation of *Kip1* mRNA accumulation. This strongly suggests that repression of p27^{Kip1} synthesis by mitogenic factors is mediated by a decrease in *Kip1* mRNA input. This finding provides one of the first demonstration that p27^{Kip1} expression is also regulated at the level of mRNA abundance in proliferating cells, probably through

a transcriptional mechanism. A decline in the level of *Kip1* mRNA was also observed in T-lymphocytes activated by immobilized anti-CD3 (Kwon et al., 1996). The second step of p27^{Kip1} elimination is an increase in the degradation rate of the protein which is mostly evident after 8 h of mitogenic stimulation. By contrast, treatment of vascular SMC with hypertrophic factors like Ang II has little effect on steady-state *Kip1* mRNA levels and less effectively promotes late degradation of the protein.

The signaling pathways which are involved in the regulation of *Kip1* mRNA expression remain to be identified. As mentioned earlier, PDGF-BB and Ang II activate several common signaling events in aortic SMC. However, significant differences are noted in the time-course of these events. For example, PDGF-BB induces a sustained activation of the MAP kinases ERK1/ERK2, whereas Ang II has a very transient effect (data not shown). In addition, mitogenic and hypertrophic factors are likely to trigger unique signaling events. Studies in pulmonary arterial SMC have shown that PDGF-BB exclusively stimulates an increase in phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (Button et al., 1994), while only thrombin, which behaves as a hypertrophic factor, induces *fosB* mRNA levels (Rothman et al., 1994). However, these observations may not be generalized to other SMC types, since both PDGF-BB and Ang II activate PI3-kinase and induce *fosB* mRNA in rat aortic SMC (data not shown). Characterization of the 5' flanking region of the mouse p27^{Kip1} gene showed that a region between -326 to -615 is sufficient to confer maximal basal promoter activity (Kwon et al., 1996; Zhang and Lin, 1997). Constructs extending beyond -615 displayed lower basal promoter activity, suggesting that a negative regulatory element may be contained in the region between -615 and -1609 (Kwon et al., 1996). However, these studies did not examine the serum or growth factor responsiveness of the various *Kip1* gene promoter constructs. Work is in progress in our laboratory to identify specific regions within the promoter of the rat *Kip1* gene which mediate PDGF-BB-dependent transcriptional repression.

The turnover of p27^{Kip1} is also subject to regulation by growth factors in vascular SMC. Stimulation with PDGF-BB resulted in a faster degradation of p27^{Kip1} than what is observed in the presence of Ang II at later time points. Strikingly, the time at which the increased turnover of p27^{Kip1} becomes manifest coincides with the apparition of the active phosphorylated form of Cdk2 in PDGF-BB-treated cells. Given the recent demonstration that cyclin E-Cdk2 directly phosphorylates p27^{Kip1} on threonine 187 and promotes its elimination from the cell (Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997), it is tempting to speculate that the different rates of p27^{Kip1} turnover observed in PDGF-BB or Ang II-treated cells are a reflect of their differential ability to activate Cdk2. In support of this idea, we found that *in vivo* phosphorylation of p27^{Kip1} increases after 8 h in cells exposed to PDGF-BB but not in response to Ang II (data not shown). It is noteworthy that detection of the active phosphorylated form of Cdk2 (threonine 160 phosphorylation) by immunoblot analysis always precedes the induction of full histone H1 kinase activity (compare Figures 2 and 3). One possible interpretation of this observation is that activated cyclin E-Cdk2 first phosphorylates p27^{Kip1}, which directly interacts with the cyclin subunit, and promotes its degradation. The elimination of p27^{Kip1} then results in the activation of more cyclin E-Cdk2, allowing the detection of histone H1 kinase activity. Such a model involving a positive feedback loop of Cdk2 activation has recently been proposed (Sheaff et al., 1997). In vascular SMC, the initial stimulus that changes the amount of active cyclin E-Cdk2 and triggers the feedback loop could be the transient downregulation of *Kip1* mRNA expression.

Phosphorylation by Cdk2 is unlikely to be the sole mechanism which regulates the proteolysis of p27^{Kip1}. Indeed, significant degradation of the inhibitor is observed during the first hours of growth factor stimulation, in the absence of detectable histone H1 kinase activity (Pagano et al., 1995; Agrawal et al., 1996; this study). We also found that in vascular SMC, p27^{Kip1} is phosphorylated during early G₁ phase (data not

shown). These observations suggest that other protein kinases and/or mechanisms signal p27^{Kip1} for degradation. In this respect, it was recently reported that Ras signaling is required for downregulation of p27^{Kip1} in rodent fibroblasts (Aktas et al., 1997; Takuwa and Takuwa, 1997).

It has been postulated that the failure of Ang II to stimulate vascular SMC hyperplasia is due to autocrine production of the antimitogenic cytokine TGF- β 1 by these cells (Gibbons et al., 1992; Koibuchi et al., 1993). However, our results do not support this model. First, active TGF- β 1 was not detected in the supernatant of Ang II-treated aortic SMC. Second, the use of a neutralizing antibody against TGF- β 1 in combination with Ang II did not potentiate DNA synthesis in these cells. Third, pretreatment of aortic SMC for 4 h with Ang II before PDGF-BB stimulation (data not shown) or simultaneous addition of both factors did not affect the mitogenic response to PDGF-BB.

Previous *in vivo* studies have demonstrated that Cdk2 function is required for intimal SMC accumulation after angioplasty in the rat carotid artery (Abe et al., 1994; Morishita et al., 1994). In addition, Cdk2 expression is temporally correlated with vascular SMC proliferation after angioplasty (Wei et al., 1997). More recently, it was reported that p27^{Kip1} is markedly upregulated after balloon angioplasty in the rat carotid artery and that high levels of p27^{Kip1} expression correlates with downregulation of Cdk2 kinase activity (Chen et al. 1997). Ectopic overexpression of p27^{Kip1} in injured arteries attenuated neointimal lesion formation. A recent study also presented evidence that polymerized collagen inhibits aortic SMC proliferation *in vitro* through α_2 integrin-mediated upregulation of p27^{Kip1} (Koyama et al., 1996). Thus, the results presented here together with these findings clearly identify p27^{Kip1} as a major regulator of vascular SMC growth response.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Jacques Pouysségur, Maureen O'Connor and Joan Massagué for valuable reagents; Drs Mona Nemer and Angelo Corderone for rat cardiac fibroblasts; and Dr Gilles L'Allemain for helpful discussions. M.J.S. is recipient of a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. S.M. is a Scientist of the Medical Research Council of Canada. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT-14168).

FOOTNOTES

Abbreviations used in this paper: Ang II, angiotensin II; PDGF-BB, platelet-derived growth factor-BB; SMC, smooth muscle cells; Cdk, cyclin-dependent kinase; CAK, Cdk-activating kinase; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1

REFERENCES

- Abe, J., W. Zhou, J. Taguchi, N. Takuwa, K. Miki, H. Okasaki, K. Kurokawa, M. Kumada, and Y. Takuwa. 1994. Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc2 and cdk2 oligonucleotides in rat carotid artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:16-24.
- Agrawal, D., P. Hauser, F. McPherson, F. Dong, A. Garcia, and W.J. Pledger. 1996. Repression of p27kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 16:4327-4336.
- Aktas, H., H. Cai, and G.M. Cooper. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27kip1. *Mol. Cell. Biol.* 17:3850-3857.
- Aprelikova, O., Y. Xiong, and E.T. Liu. 1995 Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J. Biol. Chem.* 270:18195-18197.
- Berk, B.C., V. Vekshtein, H.M. Gordon, and T. Tsuda. 1989. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13:305-314.
- Bunkenburg, B., T. van Amelsvoort, H. Rogg, and J.M. Wood. 1992. Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 20: 746-754.
- Button, D., A. Rothman, C. Bongiorno, E. Kupperman, B. Wolner, and P. Taylor. 1994. Agonist-selective regulation of polyphosphoinositide metabolism in pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269:6390-6398.

- Catt, K.J., K. Sandberg, and T. Balla. 1993. *in* Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. M.K. Raizada, M.I. Phillips, and C. Summers., editors. CRC Press/Boca Raton, USA. 307-356.
- Chan, F.K., J. Zhang, L. Cheng, D.N. Shapiro, and A. Winoto. 1995. Identification of human and mouse p19, a novel Cdk4 and Cdk6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol. Cell. Biol.* 15:2682-2688.
- Chen, D., K. Krasinski, D. Chen, A. Sylvester, J. Chen, P.D. Nisen, and V. Andrés. 1997. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity in vascular smooth muscle cells by p27^{kip1}, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J. Clin. Invest.* 99:2334-2341.
- Chiu, A.T., W.A. Roscoe, D.E. McCall, and P.B.M.W.M. Timmermans. 1991. Angiotensin II-1 receptors mediate both vasoconstrictor and hypertrophic responses in rat aortic smooth muscle cells. *Receptor* 1:133-140.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio Techniques* 15:532-537.
- Claesson-Welsh, L. 1994. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J. Biol. Chem.* 269:32023-32026.
- Coats, S., W.M. Flanagan, J. Nourse, and J.M. Roberts. 1996. Requirement for p27^{Kip1} for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272:877-880.
- Daemen, M.J.A.P., D.M. Lombardi, F.T. Bosman, and S.M. Schwartz. 1991. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ. Res.* 68: 450-456.

- deBlois, D., M. Viswanathan, J.E. Su, A.W. Clowes, J.M. Saavedra, and S.M. Schwartz. 1996. Smooth muscle DNA replication in response to angiotensin II is regulated differently in the neointima and media at different times after balloon injury in the rat carotid artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 1130-1137.
- Draetta, G.F. 1994. Mammalian G1 cyclins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 842-846.
- Dubey, R.K., A. Roy, and H.W. Overbeck. 1992. Cultured or renal arteriolar smooth muscle cells: mitogenic responses to angiotensin II. *Circ. Res.* 71: 1143-1152.
- Duff, J.L., B.C. Berk, and M.A. Corson. 1992. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188:257-264.
- El-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
- Firpo, E.J., A. Koff, M.J. Solomon, and J.M. Roberts. 1994. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 14:4889-4901.
- Geisterfer, A.A.T., M.J. Peach, and G.K. Owens. 1988. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 62:749-756.
- Giasson, E., and S. Meloche. 1995. Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth cells. *J. Biol. Chem.* 270:5225-5231.
- Giasson, E., M.J. Servant, and S. Meloche. 1997. 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.* 272:26879-26886.

- Gibbons, G.H., R.E. Pratt, and V.J. Dzau. 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 90: 456-461.
- Grainger, D.J., C.M. Witchell, P.L. Weissberg, and J.C. Metcalfe. 1994. Mitogens for adult rat aortic vascular smooth muscle cells in serum-free primary culture. *Cardiovasc. Res.* 28:1238-1242.
- Grana, X., and E.P. Reddy. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11:211-219.
- Gu, Y., J. Rosenblatt, and D.O. Morgan. 1992. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* 11:3995-4005.
- Gu, Y., C.W. Turck, and D.O. Morgan. 1993. Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366:707-710.
- Guan, K.L., C.W. Jenkins, Y. Li, M.A. Nichols, X. Wu, C.L. O'keefe, A.G. Matera, and Y. Xiong. 1994. Growth suppression by p18, a p16 ink4/MTS1- and p14 ink4B/MTS2-related Cdk6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes and Dev.* 8:2939-2952.
- Hannon, G.J., and D. Beach. 1994. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-261.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
- Heldin, C.-H. 1997. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *FEBS Letters* 410:17-21.
- Hengst, L., and S.I. Reed. 1996. Translational control of p27kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271:1861-1864.

- Hirai, H., M.F. Roussel, J.-Y. Kato, R.A. Ashmun, and C.J. Sherr. 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell Biol.* 15:2672-2681.
- Ishida, M., M.B. Marrero, B. Schieffer, T. Ishida, K.E. Bernstein, and B.C. Berk. 1995. Angiotensin II activates pp60^{c-src} in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 77:1053-1059.
- Itazaki, K., M. Hara, N. Itoh, and M. Fujimoto. 1995. A long-term receptor stimulation is requisite for angiotensin II-dependent DNA synthesis in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 291: 417-425.
- Jelinek, T., and M.J. Weber. 1993. Optimization of the resolution of phosphoamino acids by one-dimensional thin-layer electrophoresis. *Bio Techniques* 15:629-630.
- Kamps, M.P. 1991. Determination of phosphoamino acid composition by acid hydrolysis of protein blotted to Immobilon. *Methods Enzymol.* 201:21-27.
- Kato, J., M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massagué, and C.J. Sherr. 1994. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase-4 activation. *Cell* 79:487-496.
- Knoblich, J.A., K. Sauer, L. Jones, H. Richardson, R. Saint, and C.F. Lehner. 1994. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77:107-120.
- Koibuchi, Y., W.S. Lee, G.H. Gibbons, and R.E. Pratt. 1993. Role of transforming growth factor- β 1 in the cellular growth response to angiotensin II. *Hypertension.* 21: 1046-1050.

- Koyama, H., E.W. Raines, K.E. Bornfeldt, J.M. Roberts, and R. Ross. 1996. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of cdk2 inhibitors. *Cell* 87:1069-1078.
- Krude, T., M. Jackman, J. Pines, and R.A. Laskey. 1997. Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 88:109-119.
- Kwon, T.K., J.E. Nagel, M.A. Buchholz, and A.A. Nordin. 1996. Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27^{kip1}. *Gene* 180:113-120.
- L'Allemain, G., J.N. Lavoie, N. Rivard, V. Baldin, and J. Pouyssegur. 1997. Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. *Oncogene* 14:1981-1990.
- Lavoie, J.N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Müller, and J. Pouyssegur. 1996. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44^{mapk} and negatively by the p38/HOG^{mapk} pathway. *J. Biol. Chem.* 271: 20608-20616.
- Leduc, I., P. Haddad, E. Giasson, and S. Meloche. 1995. Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 48:582-592.
- Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massagué. 1995. Cloning of p57^{KIP2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and a tissue distribution. *Genes & Dev.* 9: 639-649.
- Marrero, M.B., B. Schieffer, W.G. Paxton, L. Heerdt, B.C. Berk, P. Delafontaine, and K.E. Bernstein. 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* 375:247-250.
- Massague, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641.

- Matsuoka, S., M.C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, J.W. Harper, and S.J. Elledge. 1995. p57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes & Dev.* 9:650-662.
- Matsushime, H., D.E. Quelle, S.A. Shurtleff, M. Shibuya, C.J. Sherr, and J.-Y. Kato. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:2066-2076.
- Meloche, S. 1995. Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by a sustained activation of p44^{mapk} and p42^{mapk} isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J. Cell. Physiol.* 163:577-588.
- Molloy, C.J., D.S. Taylor, and H. Weber. 1993. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 268:7338-7345.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
- Morishita, R., G.H. Gibbons, K.E. Ellison, M. Nakajima, H. von der Leyen, L. Zhang, Y. Kaneda, T. Ogihara, and V.J. Dzau. 1994. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk2 kinase oligonucleotides. *J. Clin. Invest.* 93:1458-1464.
- Murray, A., and T. Hunt. 1993. The cell cycle, an introduction. W.H. Freeman and Company Press, New York, USA. 183 pp.
- Noda, A., Y. Ning, S.F. Venable, O.M. Pereira-Smith, and J.R. Smith. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell. Res.* 211:90-98.
- Nourse, J., E. Firpo, W.M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M.H. Lee, J. Massagué, G. Crabtree, and J.M. Roberts. 1994. Interleukin-2-mediated elimination of p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372:570-573.

- Ohtsubo, M., A.M. Theodoras, J. Schumacher, J.M. Roberts, and M. Pagano. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 15:2612-2624.
- Owens, G.K., A.A.T. Geisterfer, Y. W.-H. Yang, and A. Komorika. 1988. Transforming growth factor- β -induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 107: 771-780.
- Owens, G.K. 1989. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 257:H1755-H1765.
- Owens, G.K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 75:487-517.
- Pagano, M., S.W. Tam, A.M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, P.R. Yew, G.F. Draetta, and M. Rolfe. 1995. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-685.
- Pardee, A.B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.
- Polte, T.R., A.J. Naftilan, and S.K. Hanks. 1994. Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *J. Cell. Biochem.* 55:106-119.
- Polyak, K., M.H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J.M. Roberts, P. Tempst, and J. Massagué. 1994a. Cloning of p27^{kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78:59-66.

- Polyak, K., J. Kato, M.J. Solomon, C.J. Sherr, J. Massagué, J.M. Roberts, and A. Koff. 1994b. p27^{Kip1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Dev.* 8:9-22.
- Raines, E.W., D.F. Bowen-Pope, and R. Ross. 1990. Peptide growth factors and their receptors. *In Handbook of Experimental Pharmacology.* M.B. Sporn, and A.B. Roberts, editors. Springer-Verlag Press/New York, USA. 173-262.
- Reynisdottir, I., K. Polyak, A. Iavarone, and J. Massague. (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β . *Genes & Dev.* 9: 1831-1845.
- Rivard, N., G. L'Allemain, J. Bartek, and J. Pouyssegur. 1996. Abrogation of p27^{Kip1} by cDNA antisense suppresses quiescence (G₀ state) in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271:18337-18341.
- Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.
- Rothman, A., B. Wolner, D. Button, and P. Taylor. 1994. Immediate-early gene expression in response to hypertrophic and proliferative stimuli in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 269:6399-6404.
- Russo, A.A., P.D. Jeffrey, A.K. Patten, J. Massague, and N.P. Pavletich. 1996. Crystal structure of the p27^{Kip1} cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382:325-331.
- Sadoshima, J. and S. Izumo. 1993. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 73: 413-423.
- Schorb, W., G.W. Booz, D.E. Dostal, K. M. Conrad, K.C. Chang, and K.M. Baker. 1993. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 72: 1245-1254.

- Schwartz, S.M., G.R. Campbell, and J.H. Campbell. 1986. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ. Res.* 58:427-444.
- Sclafani, R.A. 1996. Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:788-794.
- Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.
- Servant, M.J., E. Giasson, and S. Meloche. 1996. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271:16047-16052.
- Sheaff, R.J., M. Groudine, M. Gordon, J.M. Roberts, and B.E. Clurman. 1997. Cyclin E-Cdk2 is a regulator of p27kip1. *Genes & Dev.* 11:1464-1478.
- Sherr, C.J. 1994 G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 79:551-555.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev.* 9:1149-1163.
- Slingerland, J.M., L. Hengst, C.H. Pan, D. Alexander, M.R. Stampfer, and S.I. Reed. 1994. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:3683-3694.
- Su, E.J., D.M. Lombardi, J. Wiener, M.J.A.P. Daemen, M.A. Reidy, and Schwartz, S.M. 1998. Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II and III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor. *Circ. Res.* 82: 321-327.
- Takuwa, N., and Y. Takuwa. 1997. Ras activity late in G₁ phase required for p27^{kip1} downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 17:5348-5358.

- Timmermans, P.B.M.W.M., P.C. Wong, A.T. Chiu, W.F. Herblin, P. Benfield, D.J. Carini, R.J. Lee, R.R. Wexler, J.A.M. Saye, and R.D. Smith. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45:205-251.
- Toyoshima, H., and T. Hunter. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78:67-74.
- Tsuda, T., Y. Kawahara, Y. Ishida, M. Koide, K. Shii, and M. Yokoyama. 1992. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 71:620-630.
- van den Heuvel, S., and E. Harlow. 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262:2050-2054.
- van Kleef, E.M., J.F.M. Smits, J.G.R. De Mey, J.P.M. Cleutjens, D.M. Lombardi, S.M. Schwartz, and M.J.A.P. Daemen. 1992. α_1 -adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ. Res.* 70: 1122-1127.
- Vlach, J., S. Hennecke, and B. Amati. 1997. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1}. *EMBO J.* 16:5334-5344.
- Wei, G.L., K. Krasinski, M. Kearney, J.M. Isner, K. Walsh, and V. Andrés. 1997. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ. Res.* 80:418-426.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
- Winston, J., F. Dong, and W.J. Pledger. 1996. Differential modulation of G₁ cyclins and the CDK inhibitor p27^{kip1} by platelet-derived growth factor and plasma factors in density arrested fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271:11253-11260.

- Xiong, Y., G.J. Hannon, H. Zang, D. Casso, R. Kobayasi, and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
- Zhang, Y., and S.C. Lin. 1997. Molecular characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1353:307-317.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Comparative effects of Ang II and PDGF-BB on the growth of aortic SMC

(A) DNA synthesis. Quiescent rat aortic SMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II (open circles) or 50 ng/ml PDGF-BB (closed circles) and the rate of DNA synthesis was measured by [³H]thymidine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. (B) Cell protein content. Quiescent aortic SMC were stimulated with Ang II or PDGF-BB for 72 h. The rate of protein synthesis was measured by [³H]leucine incorporation and the number of cells counted on parallel plates. The results are expressed as the relative ratio between [³H]leucine incorporation and cell number. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. The data are representative of at least three different experiments with similar results.

Fig. 2: Effects of Ang II and PDGF-BB on the accumulation of G₁ cyclins and the expression level of Cdks in aortic SMC

Quiescent aortic SMC were stimulated with 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB for different times over a 24 h period. Equal amounts of lysate proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with antibodies specific to the different cyclins and Cdks. The proteins were visualized by chemiluminescence detection. Similar results were obtained in five different experiments.

Fig. 3: Regulation of Cdk4 and Cdk2 enzymatic activity by Ang II and PDGF-BB during G₁ progression

Quiescent aortic SMC were stimulated for different times with 100 nM Ang II (open bars) or 50 ng/ml PDGF-BB (filled bars). Detergent lysates of the cells were prepared and equal amounts of proteins were subjected to immunoprecipitation with specific anti-Cdk4 (A) or anti-Cdk2 (B) antibodies. The phosphotransferase activity of the immunoprecipitates was assayed as described under Materials and Methods using GST-pRb and histone H1 as substrates, respectively. The enzymatic activities are expressed as picomoles of phosphate incorporated into the substrate per min per mg of lysate protein. Similar results were obtained in three different experiments.

Fig. 4: Ang II fails to stimulate the phosphorylation of Cdk2

(A) Phosphorylation of Cdk2. Quiescent aortic SMC were stimulated for 20 h with 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB and labeled with [³²P]phosphoric acid during the last 5 h. Cell lysates were prepared and Cdk2 was immunoprecipitated using a specific antibody preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gel, transferred to PVDF membrane and analyzed by autoradiography. (B) Phosphoamino acid analysis. The ³²P-labeled protein band corresponding to Cdk2 was excised from the PVDF membrane and subjected to partial acid hydrolysis. The phosphorylated amino acids were separated by one-dimensional thin layer electrophoresis. The positions of phosphoserine (S), phosphothreonine (T), and phosphotyrosine (Y) are indicated. (C) Complex formation between Cdk2 and cyclin E. Quiescent aortic SMC were stimulated for 20 h with Ang II or PDGF-BB. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with cyclin E-specific antibody. The immunoprecipitated proteins were then analyzed by immunoblotting with antibody to Cdk2. Similar results were obtained in three different experiments.

Fig. 5: Differential modulation of p27^{Kip1} expression by Ang II and PDGF-BB

(A) Expression of p27^{Kip1} protein. Quiescent aortic SMC were stimulated with 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB for different times over a 24 h period. Equal amounts of lysate proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-p27^{Kip1} antibody and the proteins visualized by chemiluminescence detection. (B) Inhibitory activity of Ang II extracts. Quiescent aortic SMC were stimulated for 20 h with 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB. Extracts from PDGF-BB-treated cells, which contain active Cdk2, were prepared and mixed with boiled extracts from Ang II stimulated cells as described under Methods . After incubation for 90 min at 4°C, Cdk2 was immunoprecipitated and histone H1 kinase activity was determined. p27^{Kip1} was immunodepleted from boiled extracts by incubation for 1 h at 4°C with anti-p27^{Kip1} antibody. Specificity of p27^{Kip1} immunodepletion was confirmed by preincubation of the antibody with excess immunogenic (blocking) peptide. The enzymatic activities are expressed as picomoles of phosphate incorporated into histone H1 per min per mg of lysate protein. (C) Increased association of p27^{Kip1} with cyclin E-Cdk2 complexes in Ang II-treated cells. Detergent lysates of aortic SMC stimulated for 20 h with 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB were subjected to immunoprecipitation with anti-p27^{Kip1} antibody in the presence or absence of a saturating amount of immunogenic peptide. The levels of cyclin E remaining in the supernatant and of p27^{Kip1} present in the precipitate were determined by immunoblot analysis as described above. Similar results were obtained in three different experiments.

Fig. 6: Downregulation of p27^{Kip1} expression is associated with increased turnover of the protein and repression of its synthesis

(A) Turnover of p27^{Kip1} protein. Quiescent aortic SMC were pulse-labeled with [³⁵S]methionine/[³⁵S]cysteine for 60 min, after which the medium was changed with fresh medium containing 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB. At different times, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-p27^{Kip1} antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gel and analyzed by fluorography using a PhosphorImager. (B) Graphical representation of the data shown in Panel A after quantification. (C) Synthesis of p27^{Kip1}. Quiescent aortic SMC were stimulated with Ang II or PDGF-BB for the times indicated and metabolically labeled with [³⁵S]methionine/[³⁵S]cysteine during the last hour of incubation. Preparation of cell extracts and immunoprecipitation were conducted as above. Similar results were obtained in four separate experiments.

Fig. 7: PDGF-BB produces a rapid and transient decrease of *Kip1* mRNA accumulation in aortic SMC

Quiescent aortic SMC were stimulated with 100 nM Ang II or 50 ng/ml PDGF-BB for the indicated times. Total cellular RNA was extracted from the cells and analyzed by Northern hybridization using a ³²P-labeled *Kip1* probe (A). The results were normalized by rehybridization of the blot with a 18S ribosomal RNA oligonucleotide probe (B). Similar results were obtained in four different experiments.

Fig. 8: Ang II does not stimulate autocrine production of TGF-β1 in aortic SMC

(A) TGF-β1 bioassay. Mv1Lu cells were treated for 24 h with 10 pM TGF-β1 in the absence or presence of 10-15 μg/ml of TGF-β1 neutralizing antibody (TNA) or normal

rabbit IgG (NRS). (B) Conditioned medium from Ang II-stimulated aortic SMC (1:5 dilution) was added alone or in combination with 10 $\mu\text{g/ml}$ TNA to Mv1Lu cells. (C) Quiescent aortic SMC were stimulated for 24 h with 100 nM Ang II in the absence or presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ TNA or NRS. In the same experiment, the cells were stimulated with 50 ng/ml PDGF-BB alone or in the presence of 100 nM Ang II. The rate of DNA synthesis was measured by [^3H]thymidine incorporation during the last 4 to 6 h of stimulation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. The data presented are representative of at least two different experiments with similar results.

Fig.9: Ang II stimulates DNA synthesis and downregulates p27^{Kip1} expression in cardiac fibroblasts

(A) DNA synthesis. Quiescent neonatal rat cardiac fibroblasts were stimulated with 100 nM Ang II for 24 h and the rate of DNA synthesis was measured by [^3H]thymidine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations. (B) Expression level of p27^{Kip1}. Quiescent cardiac fibroblasts were stimulated with 100 nM Ang II for different times over a 24 h period. Equal amounts of lysate proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-p27^{Kip1} antibody and the proteins visualized by chemiluminescence detection. The data presented are representative of two independent experiments with similar results.

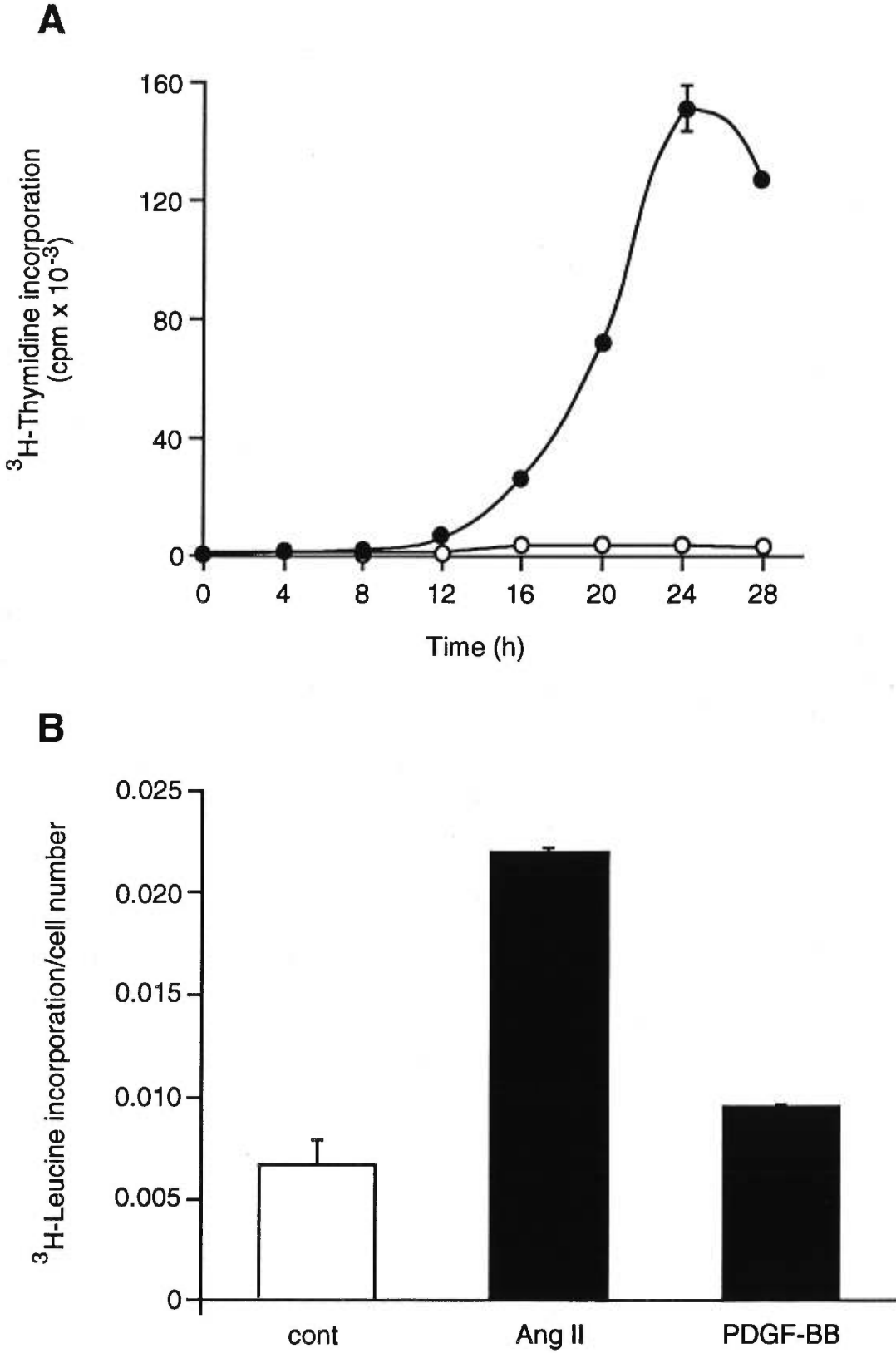


Figure 1

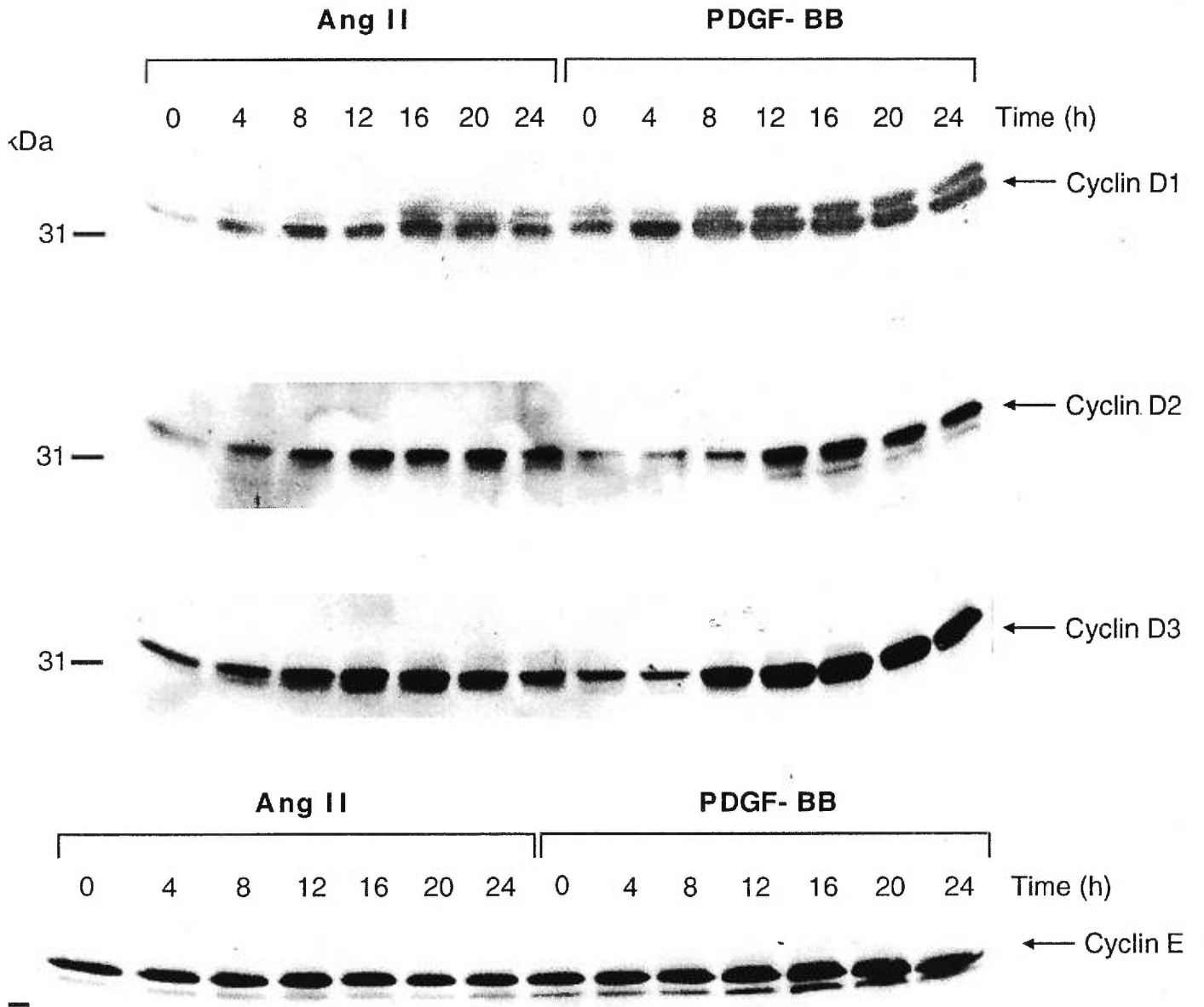


Figure 2

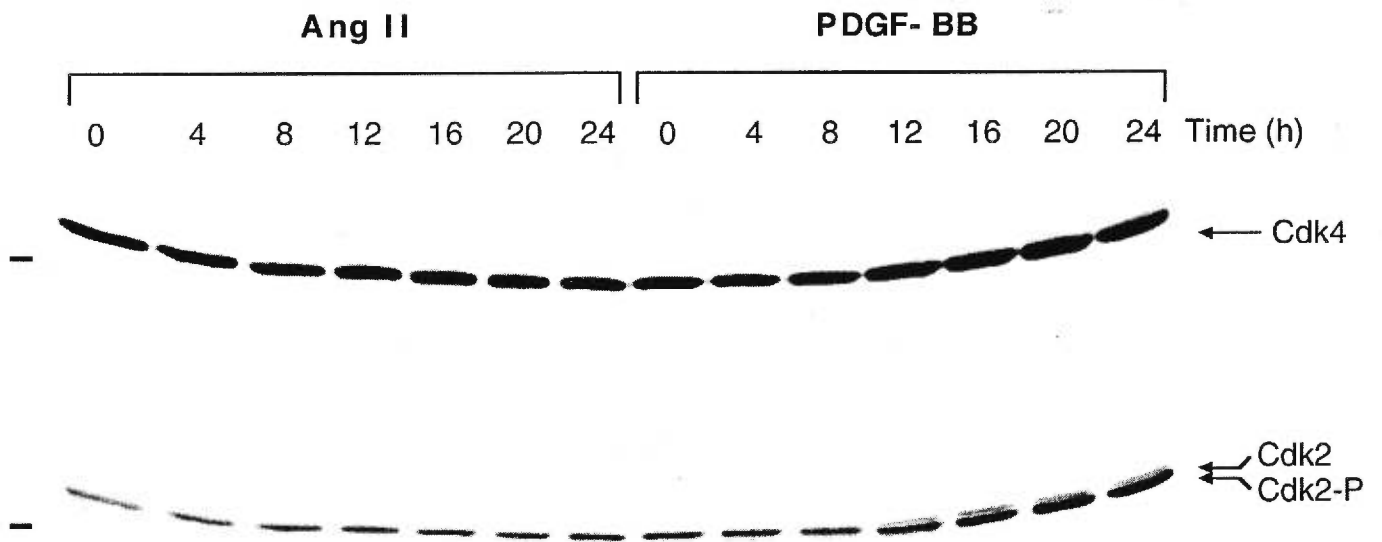
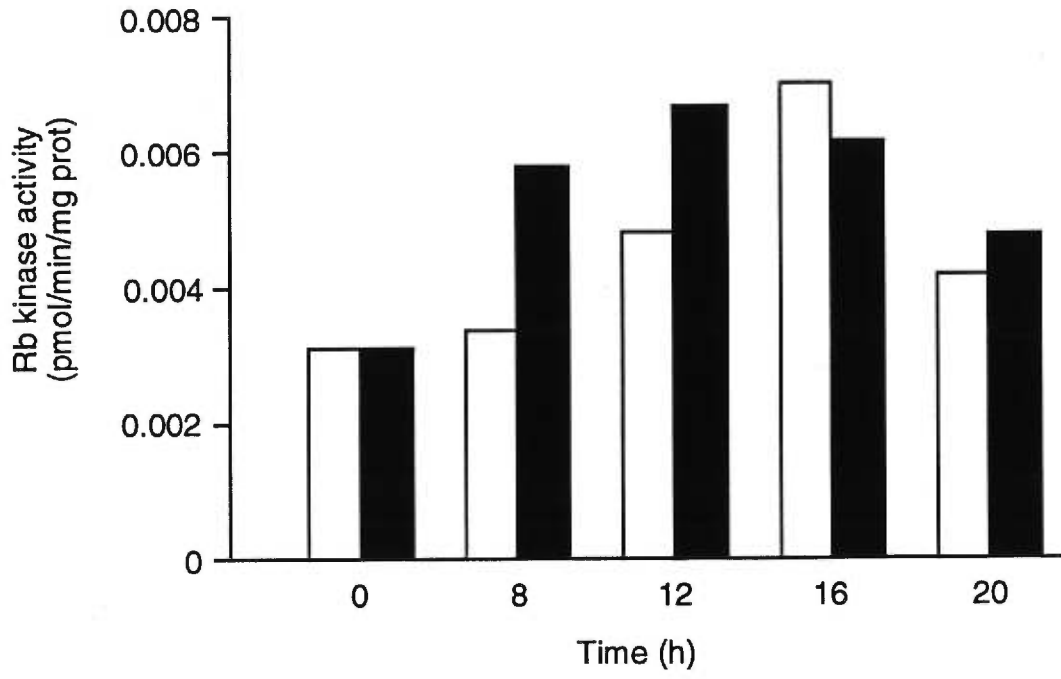


Figure 2

A



B

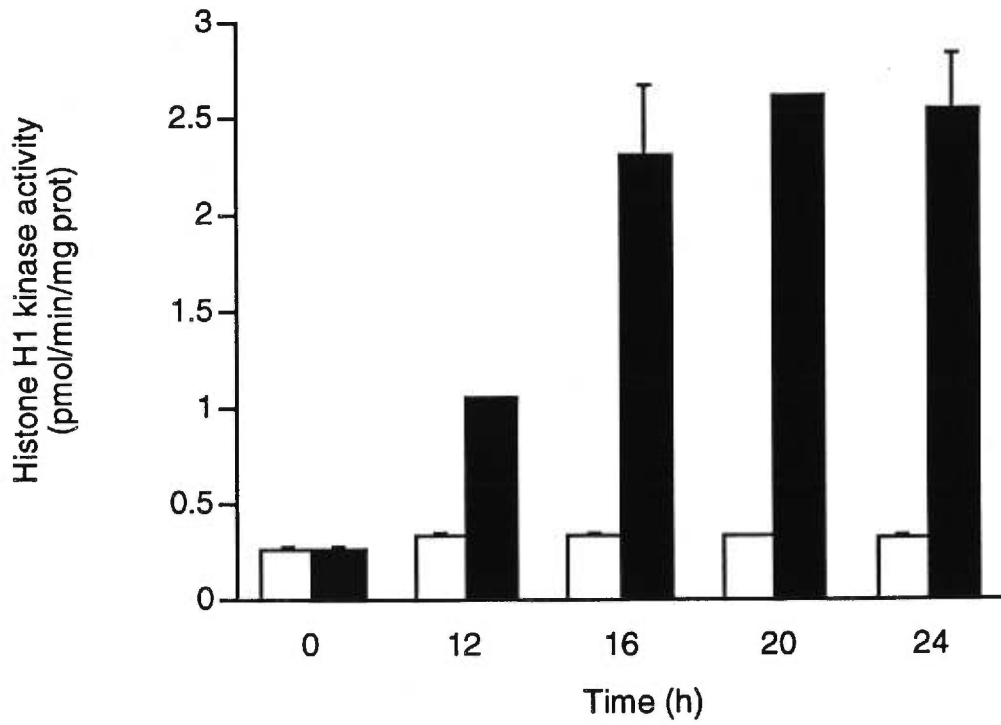


Figure 3

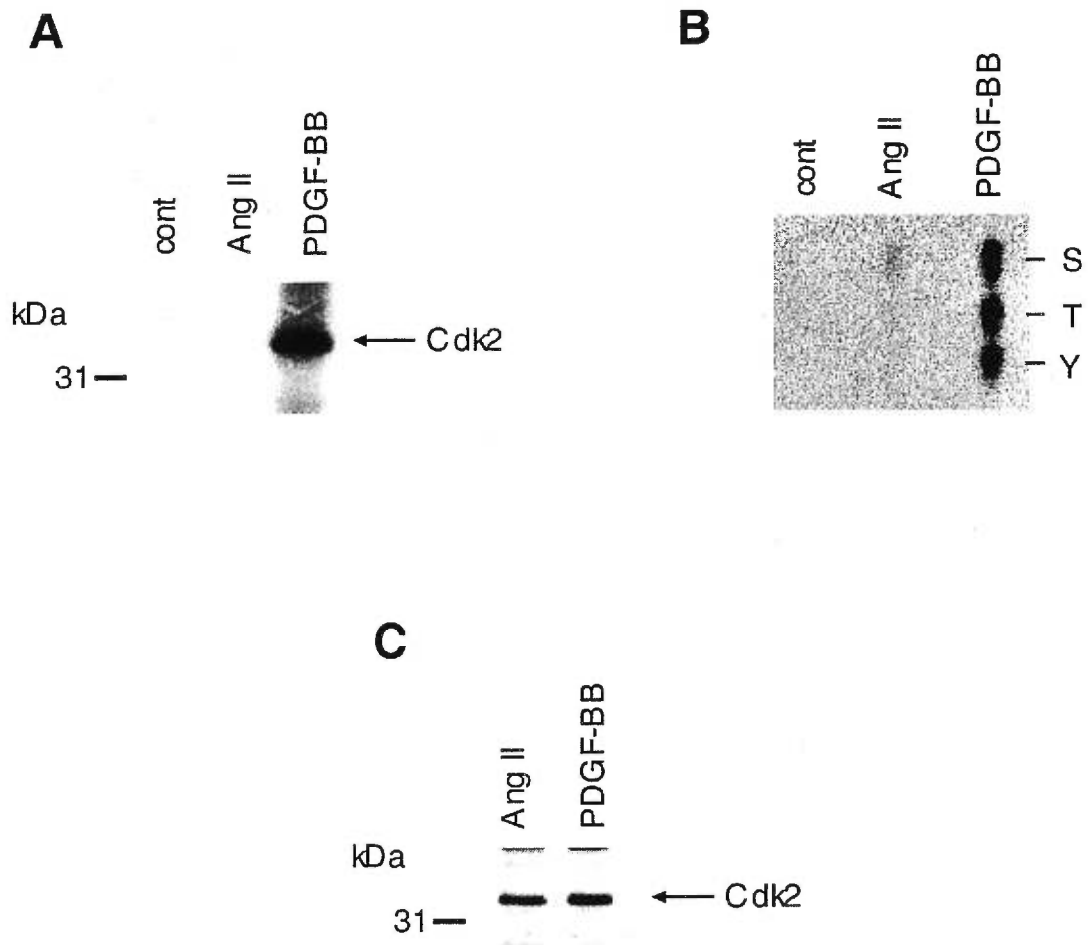
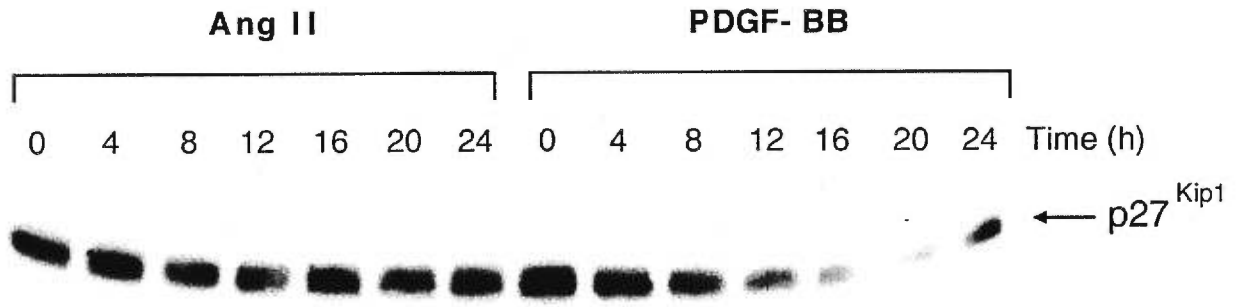


Figure 4

A



B

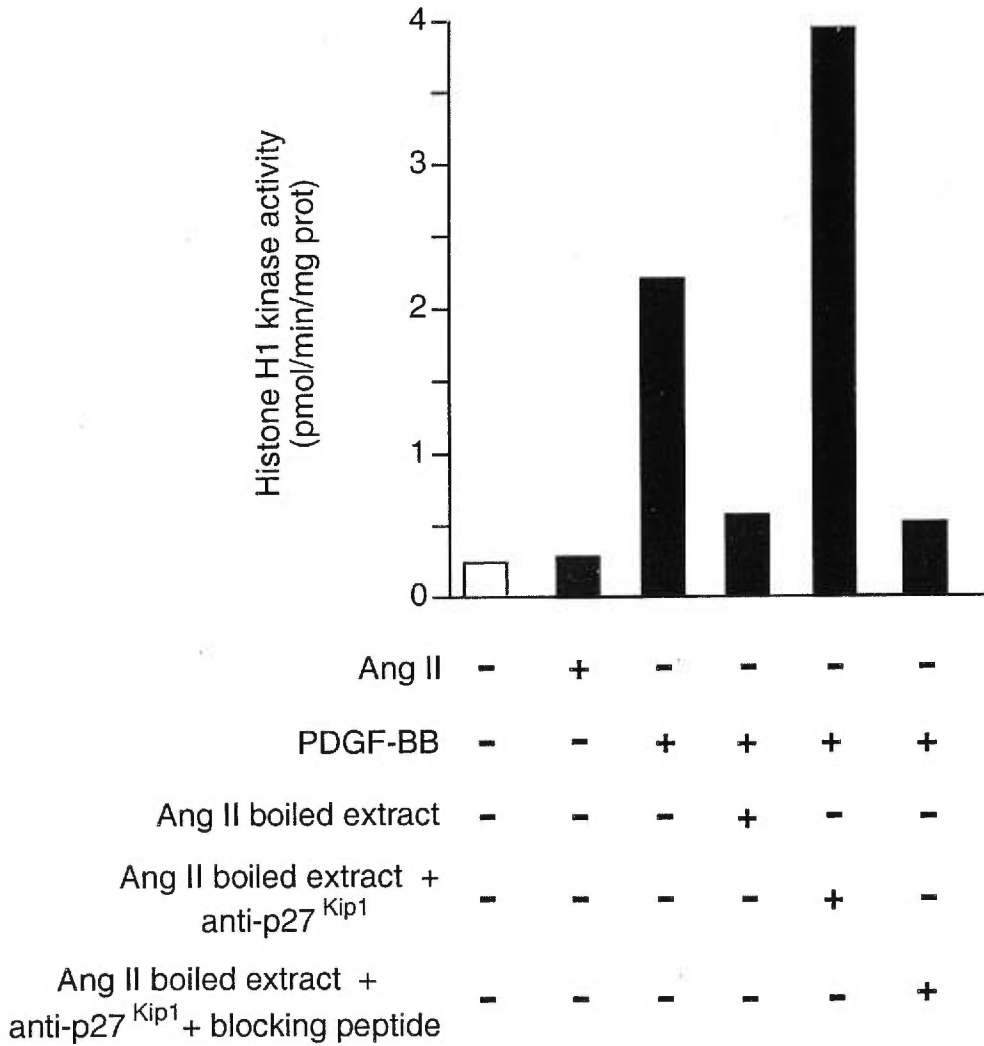
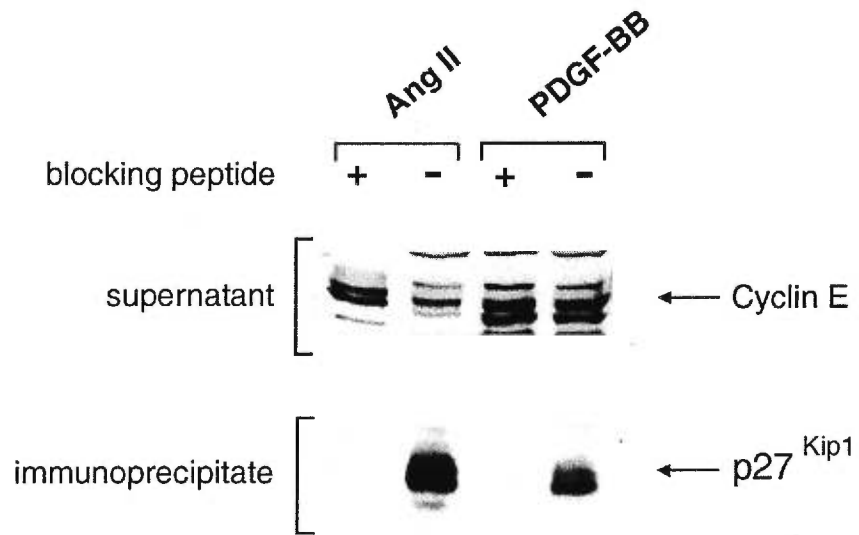


Figure 5

C**Figure 5**

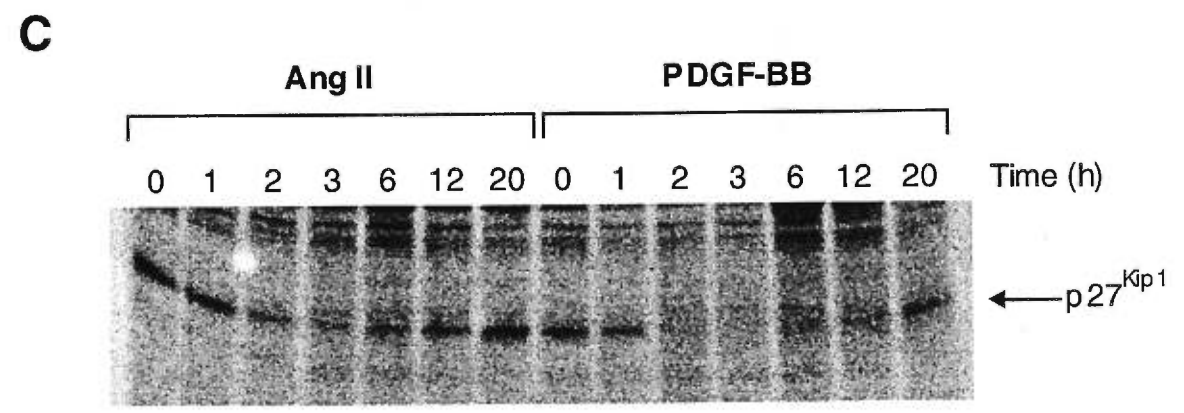
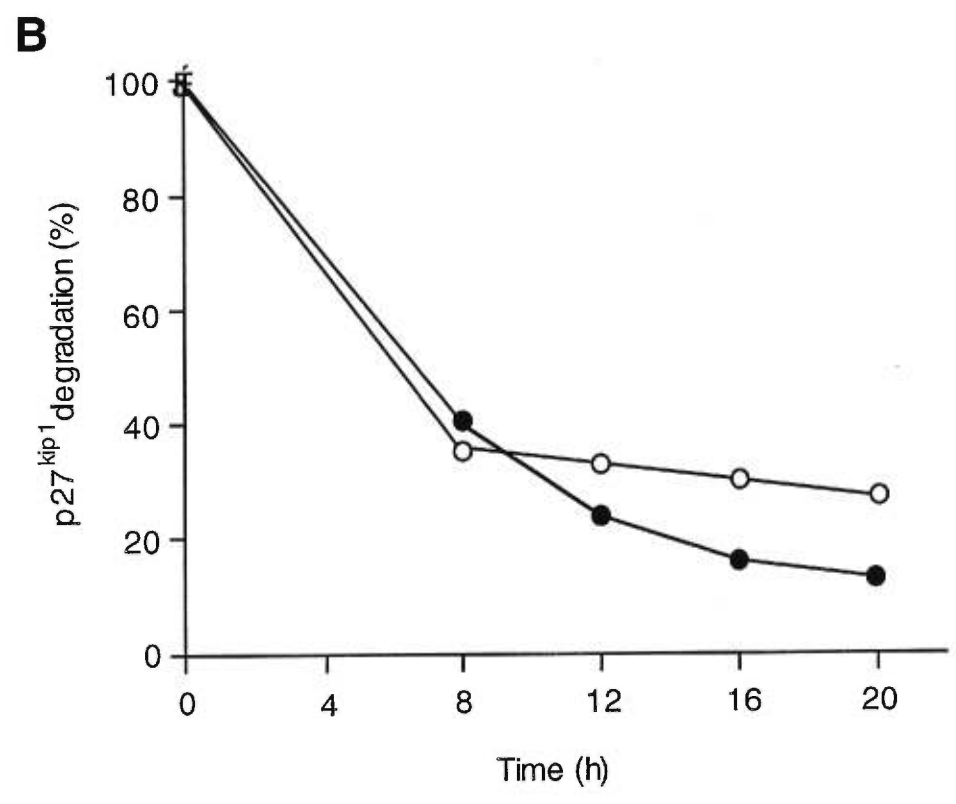
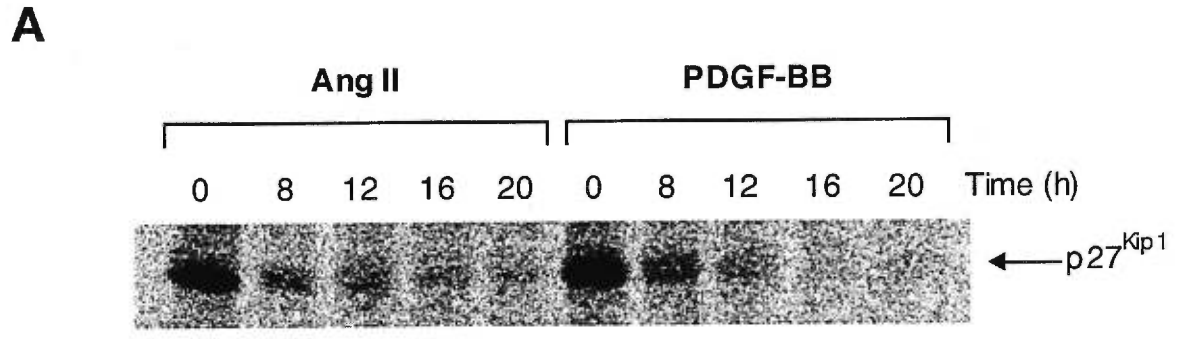


Figure 6

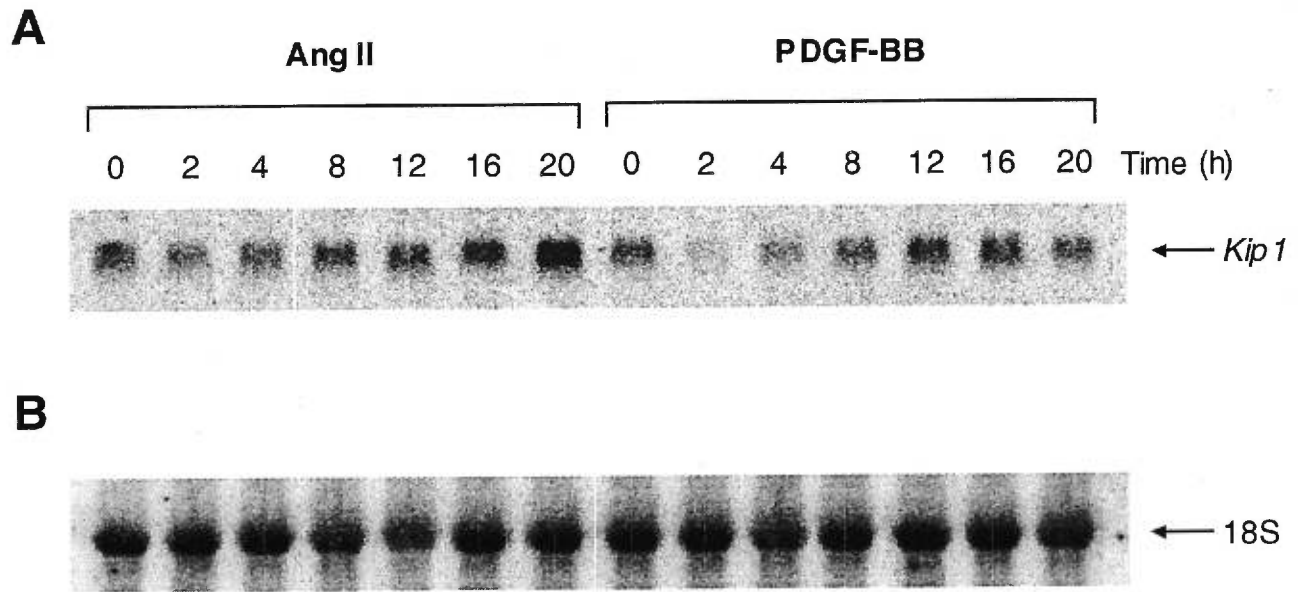


Figure 7

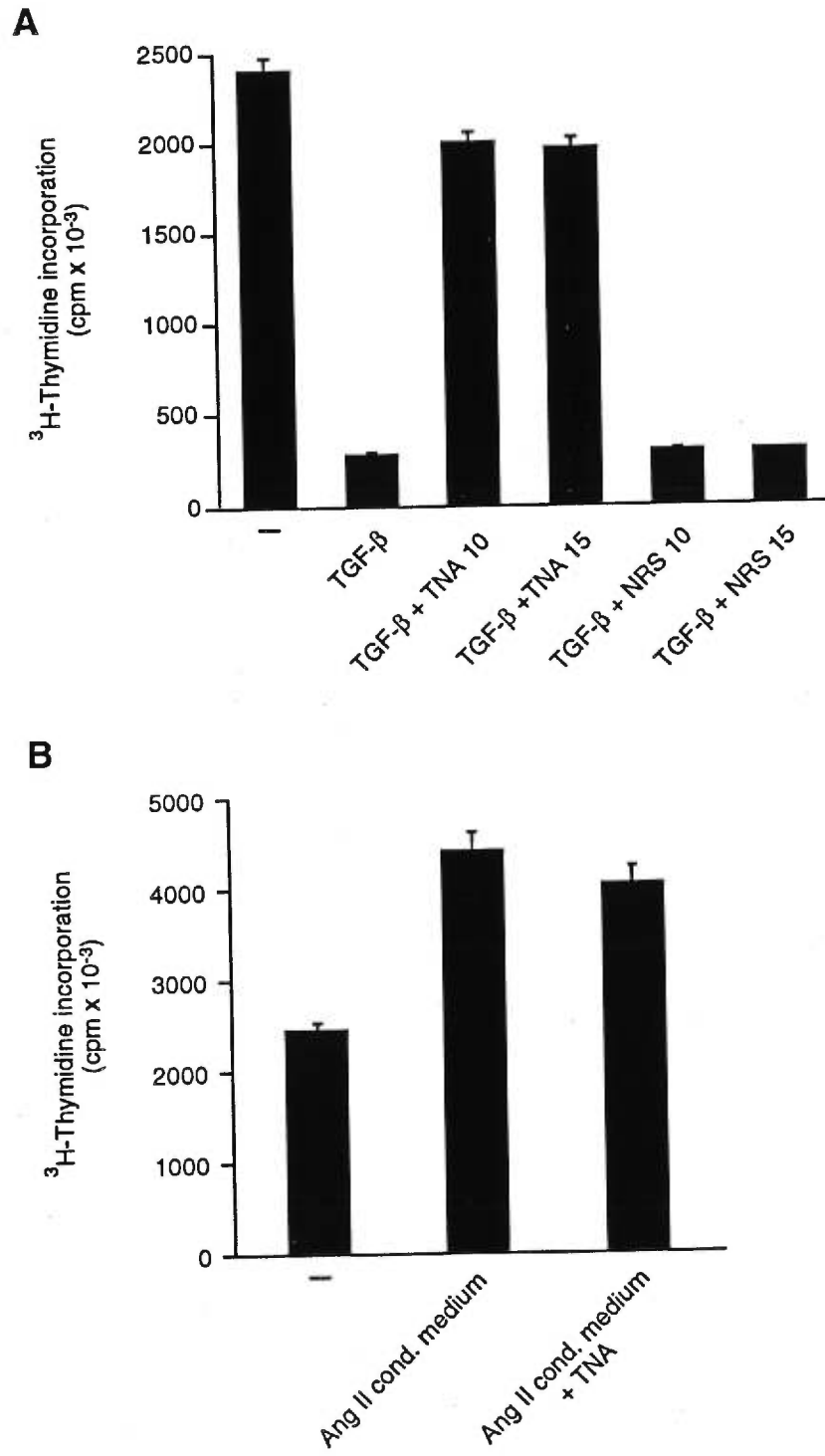
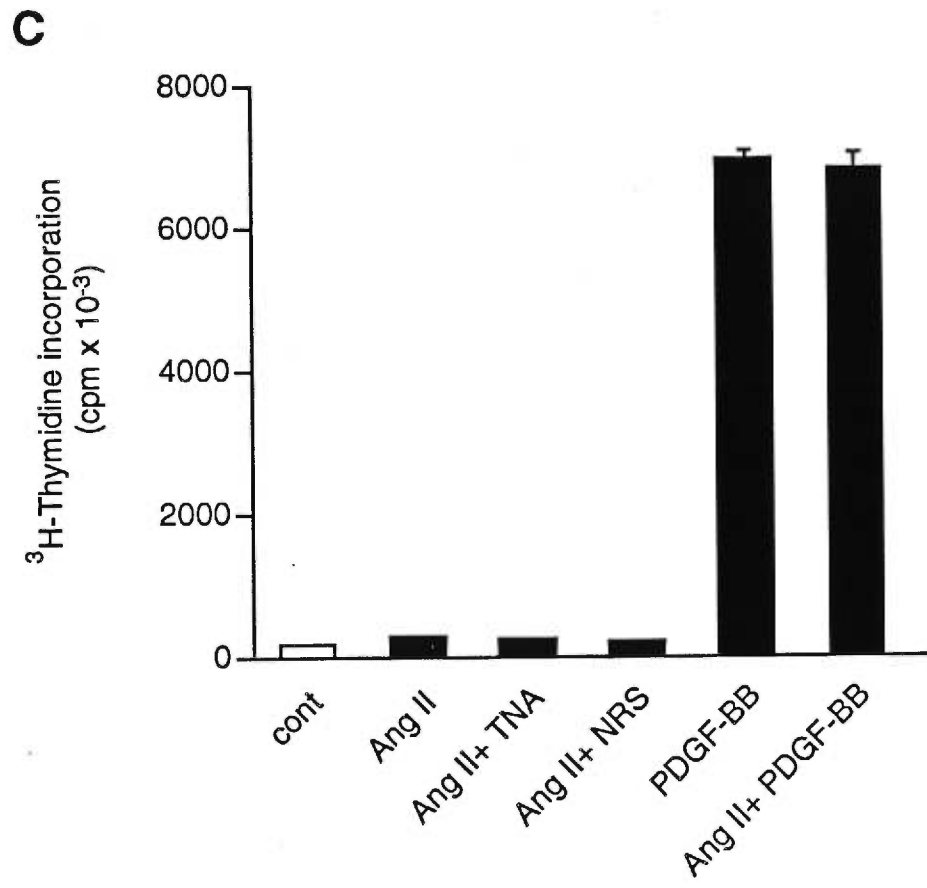
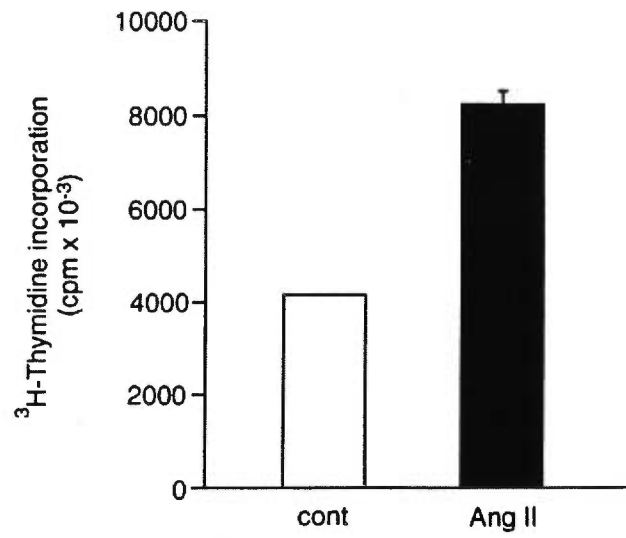
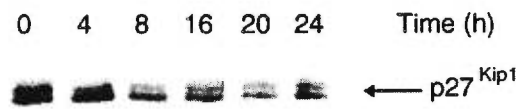


Figure 8

**Figure 8**

A**B****Figure 9**

Résumé d'article

Angiotensin II stimulates protein synthesis but not DNA synthesis in rat fibroblasts expressing the human AT₁ receptor

par

Sylvain Meloche, Marc J. Servant et Johanne Pellerin

L'Ang II est une hormone peptidique impliquée dans la régulation de la pression artérielle et de la balance électrolytique. Ce peptide joue également un rôle important dans la pathogénèse de certaines maladies cardiovasculaires. En plus de ces effets physiologiques classiques, des études récentes ont démontré que l'Ang II exerce un effet trophique sur les CMLV. Le rôle possible de cet effet hypertrophique dans le développement de l'hypertension suscite beaucoup d'intérêt à l'heure actuelle. On sait que l'Ang II exerce ses effets physiologiques en interagissant avec deux sous-types de récepteurs, désignés AT₁ et AT₂, pour activer diverses voies de signalisation intracellulaires. Le récepteur AT₁ est couplé à l'activation de la phospholipase C ainsi qu'à l'inhibition de l'adénylyl cyclase suite à son interaction avec les protéines G de la famille Gq/G11 et Gi. Des données obtenues dans notre laboratoire et par d'autres équipes ont montré que la réponse hypertrophique de l'hormone est couplée au récepteur AT₁. Cependant, très peu de données existent sur les mécanismes de transduction de cette réponse hypertrophique dans les CMLV ou autres types cellulaires. L'objectif principal de ce projet est de caractériser les voies de signalisation responsables de cette réponse hypertrophique. Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle du récepteur AT₁ humain dans la régulation de la croissance cellulaire. Pour ce faire, nous avons transfecté le gène humain codant pour le récepteur AT₁ dans des fibroblastes Rat1 et avons établi une lignée stable exprimant un nombre physiologique de récepteurs. Des études de liaison ont confirmé que le récepteur exprimé démontrait les caractéristiques pharmacologiques classiques du récepteur AT₁. La stimulation des cellules Rat1-AT₁ par l'Ang II était responsable de l'activation de la phospholipase C et aussi d'une inhibition de l'adénylyl cyclase. La production de l'inositol 1,4,5-trisphosphate était insensible à un prétraitement à la toxine de pertussis alors que la réponse à l'adénylyl cyclase était complètement bloquée par la toxine. Par la suite, nous avons analysé l'effet de l'Ang II sur la croissance cellulaire des Rat1-AT₁. L'addition de l'Ang II stimulait le taux de synthèse de protéines sans pour autant

avoir un effet sur la synthèse de l'ADN. L'effet hypertrophique de l'Ang II était accompagné par une rapide induction des gènes précoces *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* et *egr-1* ainsi qu'une activation des MAP kinases ERK et de la p70^{s6k}. Un prétraitement des cellules avec la toxine de pertussis n'avait aucun effet sur la synthèse de protéine induite par l'Ang II, indiquant que les effecteurs modulés par la protéine Gi ne sont pas associés à cette réponse. Ces résultats démontrent clairement que le récepteur AT₁ humain a une habilité intrinsèque de moduler le taux de synthèse de protéines dans des cellules cibles. De plus, ils confirment qu'une activation complète de la phospholipase C et de la voie Gi n'est pas suffisante pour amener des cellules quiescentes en phase S et déclencher la division cellulaire.

**ANGIOTENSIN II STIMULATES PROTEIN SYNTHESIS
BUT NOT DNA SYNTHESIS IN RAT FIBROBLASTS
EXPRESSING THE HUMAN AT₁ RECEPTOR**

Sylvain Meloche*, Marc J. Servant and Johanne Pellerin

Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal and Department of Pharmacology,
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8.

Short title: Human AT₁ receptor and cell growth regulation.

Abbreviations used: AII, angiotensin II; SMC, smooth muscle cells; PLC, phospholipase C; p70^{S6K}, p70 S6 kinase; MAP, mitogen-activated protein; IP₃, inositol 1, 4, 5-trisphosphate; PTX, pertussis toxin; MBP, myelin basic protein; MEM, minimum essential medium; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium.

* To whom correspondence should be addressed:

Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal
3850 St. Urbain Street
Montréal, Québec
Canada H2W 1T8

Phone: (514) 843-2733 ; Fax: (514) 843-2715

Article soumis à *Biochemical Journal*, juin 1998

SYNOPSIS

Increasing evidence suggest that angiotensin II (AII) may play a critical role in the pathophysiology of cardiovascular diseases associated with abnormal cell growth. As an approach to study the role of the human AT₁ receptor subtype in cell growth regulation, we have transfected the human gene encoding the AT₁ receptor into Rat1 fibroblast cells and established stable cell lines expressing a physiological number of receptors. Radioligand binding studies confirmed that the expressed receptor displays the typical pharmacological specificity of the AT₁ subtype. AII stimulation of Rat1-AT₁ cells was found to stimulate the activity of phospholipase C as well as to inhibit adenylyl cyclase. The production of inositol 1, 4, 5-trisphosphate was insensitive to pertussis toxin pretreatment, whereas the adenylyl cyclase response was completely blocked by the toxin. We then analyzed the effects of AII on the growth behavior of Rat1-AT₁ cells. Addition of AII alone potently stimulated the rate of protein synthesis in Rat1-AT₁ cells, without having any effect on DNA synthesis. The hypertrophic effect of AII was accompanied by the rapid induction of the early growth response genes *c-fos*, *c-jun*, *egr-1* and *c-myc*, and by the activation of the p70 S6 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. Pretreatment of the cells with pertussis toxin had no effect on AII-induced protein synthesis, indicating that Gi-regulated effectors are not involved in this response. The results presented here clearly demonstrate that the human AT₁ receptor has the intrinsic ability to regulate the rate of protein synthesis in target cells.

INTRODUCTION

Angiotensin II (AII) is an octapeptide hormone which regulates a variety of biological responses, including fluid homeostasis, aldosterone production, renal function, and contraction of vascular smooth muscles (1,2). Beside its classical effects, several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that AII is a growth factor for various cells of the cardiovascular system such as vascular smooth muscle cells (SMC), cardiac myocytes and cardiac fibroblasts (3,4). The physiological actions of AII are initiated by binding of the hormone to specific membrane receptors in target cells. To date, two pharmacologically distinct subtypes of receptors, designated AT₁ and AT₂, have been described based on their affinity for selective receptor antagonists and their sensitivity to reducing agents (for review see (5,6)). Pharmacological studies have revealed that the AT₁ receptor is the predominant subtype expressed in most adult organs and is mediating the known biological responses to AII (reviewed in (5)). The AT₁ subtype is also responsible for the growth promoting effects of AII in cultured cells (7-9).

The structure of the AT₁ receptor has been elucidated by Murphy et al. (10) and Sasaki et al. (11) who used a similar expression cloning strategy to isolate cDNA clones encoding the receptor. Analysis of these clones revealed that the AT₁ receptor is a member of the super family of G protein-coupled receptors. A second isoform of the AT₁ receptor, designated AT_{1B}, was subsequently identified in rat and mouse species (see (12) and references therein). In contrast to rodent species, the human genome apparently contains a single copy of the AT₁ receptor gene (12). Numerous studies have demonstrated that the AT₁ receptor subtype is coupled to multiple G protein-mediated signalling pathways such as stimulation of phospholipases (PL) C, D, and A₂, activation of Ca⁺⁺ channels and inhibition of adenylyl cyclase (5,13,14). Activation of the AT₁ receptor also stimulates tyrosine phosphorylation of multiple substrates in target cells.

In light of the possible involvement of AII in the development of hypertension, atherosclerosis and post-angioplastic restenosis, conditions which are all characterized by abnormal SMC growth, it appears important to define the exact consequences of human AT₁ receptor activation on cell growth. In rat vascular SMC, different results have been reported about the effects of the hormone. The prevailing opinion is that AII induces cellular hypertrophy as a result of increased protein synthesis, but not cell

division (7-9,15,16). However, other studies have shown that AII can directly stimulate cell proliferation or potentiate the effect of serum in rat vascular SMC (17-19). Little information is available on the growth regulatory properties of the human AT₁ receptor. As an approach to these questions, we have cloned the human AT₁ receptor gene and stably expressed the receptor in a rat fibroblast cell line. We report here that activation of the human AT₁ receptor increases the rate of protein synthesis in a heterologous cell line, without having any effect on DNA synthesis. This response is associated with the activation of the p70 S6 kinase (p70^{S6K}) and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways, and with the induction of early growth response genes.

EXPERIMENTAL

Materials

AII and [Sar¹, Ile⁸]AII (sarile) were purchased from Hukabel Scientific. [¹²⁵I]sarile was prepared by radioiodination of sarile using a solid-phase method as described (20). The non-peptidic receptor antagonists losartan and PD123319 were generous gifts of Du Pont Merck and Parke-Davis, respectively. Opti-MEM I medium, lipofectin and geneticin were from Life Technologies. Na¹²⁵I, [³H]IP₃, [³H]leucine, [³H]thymidine and [g³²P]ATP were obtained from Amersham. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) was from LC Services. *Bordetella pertussis* toxin (PTX) was from List Biological Laboratories, forskolin from Calbiochem and IODO-BEADS from Pierce. Protease inhibitors and bovine myelin basic protein (MBP) were from Sigma.

Cell culture

Rat1 cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% calf serum, 2 mM glutamine, and antibiotics (50 µg/ml streptomycin and 50 U/ml penicillin). The cultures were maintained at 37° C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. Rat1 cells expressing the human AT₁ receptor were cultured in the same medium containing 0.5 mg/ml of geneticin. The cells were made quiescent by incubating confluent cell cultures in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (1:1) for 24 h. Rat aortic SMC were grown and synchronized as described previously (9). For experiments involving the use of PTX, the cells were incubated for 16 h with 100 ng/ml of the toxin before addition of AII and stimulated in the continuous presence of the toxin.

Cloning of the human AT₁ receptor gene

A 644-bp reverse transcription-PCR DNA product corresponding to nucleotides 481 to 1124 of the rat AT_{1A} receptor cDNA sequence (10) was generated from total rat aortic SMC RNA. The rat AT_{1A} PCR product was labelled with [α-³²P]dCTP by random priming and used to screen a total of 5 X 10⁵ recombinant phages from a human placenta genomic library in IDASHI (provided by Dr. Morag Park, McGill University) as previously described (21). Filters were washed at a final stringency of 2 X SSC,

0.1% SDS at 55° C. From this screening, two positive phage clones were isolated and purified. Restriction mapping revealed that the two clones were identical. Clone IAT3, which contained an insert of ^a 17.5 kb, was digested with BamHI and the resulting fragments were subcloned into pBluescript vector (Stratagene). DNA was sequenced by the dideoxy chain termination method (22) using the CircumVent Thermal Cycle sequencing kit (New England Biolabs). The deduced amino acid sequence of the human AT₁ receptor was subsequently found to be identical to that reported by other groups (12).

Expression of human AT₁ receptor in Rat1 cells

A 7 kb BamHI genomic fragment containing the entire coding sequence of the human AT₁ receptor was subcloned into the eucaryotic expression vector pRC-CMV (Invitrogen) to create pCMV-AT₁. The resulting plasmid was transfected into Rat1 cells by the lipofection technique (23). Rat1 cells at 50% confluence were washed twice with Opti-MEM I medium and incubated with 5 µg of pCMV-AT₁ DNA and 20 µg of lipofectin in Opti-MEM I medium at 37° C. After 6 h of incubation, the lipofectin-DNA complex was removed and the cells were incubated in complete MEM medium for another 48 h. Stable transfected cells were then selected by their ability to grow in complete MEM medium containing 0.5 mg/ml of geneticin. Clones of geneticin-resistant Rat1 cells were isolated with cloning cylinders (Fisher Scientific), expanded, and analyzed by whole-cell radioligand binding assays. The cell clones expressing the highest number of receptors were chosen for further experiments. The results presented were obtained with a representative cell line, designated Rat1-AT₁, which expresses a physiological number of AT₁ receptors.

Receptor binding assays

For whole-cell binding assays, transfected cells were washed twice with MEM and incubated with 0.1 nM ¹²⁵I-sarile in the absence or presence of 10⁻⁵ M losartan for 60 min at 25° C in a total volume of 1 ml of MEM, 25 mM Hepes (pH 7.4), 0.1% heat-inactivated bovine serum albumin. After incubation, the medium was aspirated and the cells washed rapidly 3 times in ice-cold PBS. Bound ¹²⁵I-sarile was determined by counting the cell-associated radioactivity in a Cobra Auto-Gamma counter (Packard) after solubilization in 0.1 M NaOH.

Membranes from Rat1 cells were prepared as described (24). Saturation binding studies with intact membranes were carried out by incubating Rat1-AT₁ cell membranes (50 μ g) with increasing concentrations of ¹²⁵I-sarile in the absence or presence of 10⁻⁶ M sarile for 60 min at 25° C in a total volume of 250 μ l of binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, and 0.1% heat-inactivated bovine serum albumin). For competition studies, 50 μ g of membranes were incubated with 0.2 nM ¹²⁵I-sarile and varying concentrations of competing agents. Bound ¹²⁵I-sarile was separated from free ligand by rapid filtration through GF/B filters presoaked with 0.2% bovine serum albumin, followed by washing with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl. The filters were counted for radioactivity. Averages of duplicate determinations of bound ¹²⁵I-sarile were used for data analysis. Binding data were analyzed by non-linear least-squares curve fitting using the SCAFIT computer program (25). Equilibrium binding constants are reported as K_d and receptor concentrations are expressed as pmoles per mg of protein.

Measurement of IP₃

The intracellular mass of IP₃ was measured by a specific radioreceptor assay (26). Quiescent Rat1-AT₁ cells in 35-mm petri dishes were stimulated with AII for the indicated times at 37° C. The incubation was terminated by addition of 100 μ l of cold 40 % trichloroacetic acid (final concentration of 10 %). After extraction for 10 min on ice, the cells were scraped and centrifuged at 1,000 x g for 15 min at 4° C. The resulting supernatant was extracted five times with 5 volumes of water-saturated diethyl ether and neutralized with 10 μ l of 1 M NaHCO₃ (pH ~ 8.5). An aliquot of 50 to 100 μ l of cell extract was then assayed for IP₃ mass in the receptor binding assay. The mass of IP₃ are expressed as pmoles of IP₃ produced per mg protein.

Measurement of cyclic AMP

The activity of adenylyl cyclase was assessed on basal or forskolin-stimulated cells by measuring the intracellular mass of cAMP using a specific protein-binding assay (27). Quiescent Rat1-AT₁ cells in 35-mm petri dishes were incubated with AII in the absence or presence of 10 μ M forskolin for 20 min at 37° C. After incubation, the medium was removed and the cells washed twice with 1 ml of ice-cold PBS. The cells were then scraped into 500-1,000 μ l of cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM EDTA, boiled for 5 min, and centrifuged at 13,000 x g for 5 min at 4° C. An aliquot of 50 to 100 μ l of

Membranes from Rat1 cells were prepared as described (24). Saturation binding studies with intact membranes were carried out by incubating Rat1-AT₁ cell membranes (50 µg) with increasing concentrations of ¹²⁵I-sarile in the absence or presence of 10⁻⁶ M sarile for 60 min at 25° C in a total volume of 250 µl of binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, and 0.1% heat-inactivated bovine serum albumin). For competition studies, 50 µg of membranes were incubated with 0.2 nM ¹²⁵I-sarile and varying concentrations of competing agents. Bound ¹²⁵I-sarile was separated from free ligand by rapid filtration through GF/B filters presoaked with 0.2% bovine serum albumin, followed by washing with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl. The filters were counted for radioactivity. Averages of duplicate determinations of bound ¹²⁵I-sarile were used for data analysis. Binding data were analyzed by non-linear least-squares curve fitting using the SCAFIT computer program (25). Equilibrium binding constants are reported as K_d and receptor concentrations are expressed as pmoles per mg of protein.

Measurement of IP₃

The intracellular mass of IP₃ was measured by a specific radioreceptor assay (26). Quiescent Rat1-AT₁ cells in 35-mm petri dishes were stimulated with AII for the indicated times at 37° C. The incubation was terminated by addition of 100 µl of cold 40 % trichloroacetic acid (final concentration of 10 %). After extraction for 10 min on ice, the cells were scraped and centrifuged at 1,000 x g for 15 min at 4° C. The resulting supernatant was extracted five times with 5 volumes of water-saturated diethyl ether and neutralized with 10 µl of 1 M NaHCO₃ (pH ~ 8.5). An aliquot of 50 to 100 µl of cell extract was then assayed for IP₃ mass in the receptor binding assay. The mass of IP₃ are expressed as pmoles of IP₃ produced per mg protein.

Measurement of cyclic AMP

The activity of adenylyl cyclase was assessed on basal or forskolin-stimulated cells by measuring the intracellular mass of cAMP using a specific protein-binding assay (27). Quiescent Rat1-AT₁ cells in 35-mm petri dishes were incubated with AII in the absence or presence of 10 µM forskolin for 20 min at 37° C. After incubation, the medium was removed and the cells washed twice with 1 ml of ice-cold PBS. The cells were then scraped into 500-1,000 µl of cold 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM EDTA, boiled for 5 min, and centrifuged at 13,000 x g for 5 min at 4° C. An aliquot of 50 to 100 µl of

0.1 M NaOH. The rate of DNA synthesis was measured in triplicate wells of 24-well plates by pulse labelling cells with 0.3 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]thymidine.

Protein kinase assays

Quiescent Rat1-AT1 cells were stimulated with 100 nM AII for either 30 min (p70^{S6K} assays) or 5 min (p44^{mapk} assays). The phosphotransferase activity of p70^{S6K} was measured by an immune complex kinase assay using the S6 peptide RRRLSSLRA (Upstate Biotechnology) as substrate (9). The enzymatic activity of p44^{mapk} was measured by a specific immune complex kinase assay using MBP as substrate as described (9,26).

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of human AT₁ receptor in rat fibroblasts

As a first step in defining the functional properties of the human AII AT₁ receptor, we have cloned the human gene encoding the AT₁ receptor and stably expressed the receptor in the rat fibroblast cell line Rat1 to generate the Rat1-AT₁ cell line. Rat1 fibroblasts express very little number of endogenous AT₁ receptors and do not show any functional response to AII (Fig. 1A). These cells offer several advantages for the proposed studies: 1) they can be easily synchronized in the quiescent state by serum withdrawal; 2) they express physiological levels of transfected receptors; and 3) they respond mitogenically to various growth factors, thus allowing the possibility to study the synergy between AII and other growth factors. Fig. 1 shows the binding characteristics of the expressed human AT₁ receptor in Rat1-AT₁ cells. Computer analysis of saturation binding data obtained with ¹²⁵I-sarile indicated that the transfected receptor binds ¹²⁵I-sarile in a saturable manner with a dissociation constant (K_d) of 0.86 nM and a binding capacity of 0.84 pmole/mg of protein (Fig. 1B). This K_d value is in good agreement with the K_d of the vascular SMC receptor. Most importantly, the density of AT₁ receptor sites in the Rat1-AT₁ cell line is comparable to that observed physiologically in rat aortic SMC (M. Servant and S. Meloche, unpublished data).

The pharmacological specificity of the transfected human AT₁ receptor was examined by competition binding studies with various AII receptor ligands. As shown in Fig. 1C, the expressed receptor displayed a typical AT₁ pharmacological profile similar to that observed previously for the expressed rat and bovine AT_{1A} receptors (10,11). The rank order of potency of the ligands in competing for ¹²⁵I-sarile binding was: sarile (K_d = 0.9 nM) > AII (K_d = 6.2 nM) >> losartan (K_d = 12.3 nM). No significant binding of the AT₂ receptor antagonist PD123319 was observed even at micromolar concentrations. These results confirm that the stably expressed recombinant receptor exhibits the typical pharmacological properties of the AT₁ receptor.

AII-dependent activation of PLC and inhibition of adenylyl cyclase in Rat1-AT₁ cells

We investigated the early signalling events associated with activation of the human AT₁ receptor in the Rat1-AT₁ cell line. We first examined the ability of the receptor to regulate the activity of PLC by measuring the production of IP₃. As shown in Fig. 2A, incubation of Rat1-AT₁ cells with AII caused a 3-fold increase in the production of IP₃. The effect of AII was rapid and transient, with a maximal accumulation of IP₃ detected at 15 sec. No effect of AII on IP₃ production was observed in control Rat1 cells (data not shown). To characterize the G protein involved in AT₁ receptor-mediated PLC activation, Rat1-AT₁ cells were pretreated with PTX (100 ng/ml) for 16 h prior to AII stimulation. Fig. 2B shows that PTX had no effect on AII-induced IP₃ formation in these cells. These results demonstrate that the human AT₁ receptor is coupled to the PLC signalling pathway by a pertussis toxin-insensitive G protein. The most likely candidate G protein is a member of the G_q family of G proteins, which are known to activate PLC- β isozymes and are not substrates of PTX (29-31).

We next determined whether the expressed human AT₁ receptor could regulate the activity of adenylyl cyclase by measuring the production of cAMP. Stimulation of Rat1-AT₁ cells with AII caused a 35 % inhibition of basal cAMP production and a 40 % decrease of forskolin-induced cAMP accumulation (Fig. 2C and 2D). By contrast, no inhibition of cAMP formation was observed in untransfected Rat1 cells (data not shown). To verify the possible involvement of a G_i protein in the inhibitory effect of AII on adenylyl cyclase, we tested the effect of PTX. In contrast to phospholipase C activation, AII-induced inhibition of cAMP production in Rat1-AT₁ cells was completely PTX-sensitive (Fig. 2C). Thus, these results strongly suggest that a G_i protein couples the human AT₁ receptor to inhibition of adenylyl cyclase. This conclusion is supported by the observation that purified rabbit liver G_{i3} is able to reconstitute the AII inhibition of adenylyl cyclase in hepatocyte membranes depleted of functional endogenous G_i proteins (32).

The activation of multiple signal transduction pathways by the AII AT₁ receptor has been postulated in a number of studies, following the observation that losartan could block the effect of AII on various second-messenger systems (33-38). However, these findings did not prove that a single receptor subtype was coupled to different effectors, since at least two and possibly three distinct losartan-sensitive AT₁ receptor subtypes

have been isolated by molecular cloning. The most convincing evidence for the functional coupling of a single AT₁ receptor subtype to multiple signalling pathways came from a study by Ohnishi et al. (39) who showed that addition of AII to CHO cells transfected with the rat AT_{1A} receptor resulted in the activation of PLC, the activation of dihydropyridine-sensitive Ca⁺⁺ channels, and the inhibition of adenylyl cyclase. The results presented here confirm and extend these findings by demonstrating that the recombinant human AT₁ receptor, expressed in physiological number, can mediate stimulation of PLC as well as inhibition of adenylyl cyclase via at least two distinct G proteins.

AII induces expression of early growth response genes in Rat1-AT₁ cells

The above data allowed us to exploit the Rat1-AT₁ cell line as a model system to study the intrinsic ability of the human AT₁ receptor to regulate cell growth. We first evaluated the effect of AII on immediate-early gene expression, a cellular event closely associated with the growth response. In common with other growth factors, AII has been shown to increase mRNA expression of the *c-fos* (40-43), *c-jun* (44), *egr-1* (40,45), and *c-myc* (40,46) genes in vascular SMC and cardiac myocytes. Fig. 3 shows that AII also induced the expression of *c-fos* (7.8-fold), *c-jun* (1.4-fold), *egr-1* (4.9-fold) and *c-myc* (1.5-fold) genes in quiescent Rat1-AT₁ cells. The expression of *c-fos* was the most transient, with a peak induction observed at 30 min followed by a rapid return to basal level. The *c-jun* and *egr-1* mRNAs showed a later peak at approximately 60 min and a more sustained duration of expression, whereas the induction of the *c-myc* gene reached a maximum later on at approximately 4 h. Pretreatment with the AT₁ antagonist losartan suppressed the stimulatory effect of AII on gene expression. Thus, these results demonstrate that the human AT₁ receptor can also trigger the signals leading to expression of early growth response genes in a heterologous cell line. It is likely that induction of the *c-fos*, *c-jun*, *egr-1*, and *c-myc* genes by the receptor involves multiple signal transduction pathways (35).

Activation of the human AT₁ receptor leads to increased rate of protein synthesis but not DNA synthesis

Previous studies have established that AII can promote the growth of different tissues and cell types, leading to either cellular hypertrophy or hyperplasia. In certain cells,

such as vascular SMC, conflicting results have been reported about the ability of AII to stimulate DNA synthesis and cell division, and the question is still a matter of controversy. Pharmacological studies have demonstrated that the growth-promoting effects of AII are transmitted through AT₁ receptors (7-9,17). It is not known, however, whether individual AT₁ receptor subtypes differ in their ability to mediate the effects of AII on cell growth or if all AT₁ subtypes share the same functional properties. In a recent study, Teutsch et al. (47) reported that AII was able to stimulate DNA synthesis by 4-fold and to increase cell number in CHO cells expressing the rat AT_{1A} receptor. However, these results were obtained in a CHO cell line expressing an extremely high number of AT_{1A} receptors (4.6 pmoles/mg protein), which may lead to promiscuous and non-physiological coupling of the receptors to endogenous signalling proteins. Moreover, the authors found that the mitogenic effect of AII was delayed in comparison to the effect of serum. In order to unequivocally determine whether activation of the human AT₁ receptor could lead to hypertrophy or hyperplasia, quiescent Rat1-AT₁ cells in serum-free medium were stimulated with increasing concentrations of AII and the rate of protein synthesis and DNA synthesis was measured. The incorporation of radiolabelled precursors was assessed after 24 h of incubation. As shown in Fig. 4, AII potently stimulated protein synthesis in Rat1-AT₁ cells, with a half-maximal effect observed at 4.8 nM (n = 4). At saturating concentrations of the hormone, the rate of protein synthesis was increased by 30-50 % above basal level. Preincubation of the cells with losartan completely suppressed the stimulatory effect of AII on protein synthesis, confirming that this response is mediated by the AT₁ receptor (Fig. 4A). The addition of AII to control Rat1 cells had no effect on the rate of protein synthesis (data not shown). In contrast, AII did not change the rate of DNA synthesis in Rat1-AT₁ cells, nor in aortic SMC, after 24 h of stimulation (Fig. 5). Under the same conditions, treatment with serum induced a strong augmentation of DNA synthesis in these cells. These results clearly demonstrate that the human AT₁ receptor has the intrinsic ability to regulate the rate of protein synthesis in target cells.

Little is known on the signalling mechanisms by which G protein-coupled receptors regulate cell growth and on the nature of the G proteins involved in this response. A number of observations point out to a crucial role for a heterotrimeric G protein of the G_i subfamily in the stimulation of DNA synthesis (48-50). For example, pharmacological studies have revealed that serotonin and epinephrine can induce DNA synthesis in fibroblast cells through their coupling to a G_i-linked receptor (51,52). In

addition, PTX was found to completely abolish the mitogenic effect of serotonin, thrombin and lysophosphatidic acid in fibroblast cells (52-54). It was therefore of interest to address the role of G_i -mediated signals in the hypertrophic response mediated by the human AT_1 receptor. As shown in Fig. 6, pretreatment of Rat1- AT_1 cells with 100 ng/ml PTX for 16 h did not affect the stimulatory effect of AII on the rate of protein synthesis. Similar results were observed in rat aortic SMC (Fig. 6), thereby indicating that G_i -regulated effectors are unlikely to be important for the stimulatory effect of AII on protein synthesis. These studies also confirm the hypothesis that full activation of phospholipase C and G_i -regulated pathways is not sufficient to commit quiescent cells to enter S phase (48). Mitogenic factors like thrombin or lysophosphatidic acid must trigger additional signalling events in their target cells.

AII stimulates the enzymatic activity of p70S6K and MAP kinase in Rat1- AT_1 cells

To gain further insight in the mechanisms by which activation of the human AT_1 receptor leads to the overall stimulation of protein synthesis, we examined the ability of AII to regulate the activity of p70S6K in Rat1- AT_1 cells. Multiple phosphorylation of the 40S ribosomal protein S6 by p70S6K has been closely correlated with the stimulatory effect of growth factors on translation efficiency (55). Moreover, we have previously reported that blockade of p70S6K activation with rapamycin is associated with a significant inhibition of AII-induced protein synthesis in rat aortic SMC (9). As shown in Fig. 7A, addition of AII to quiescent Rat1- AT_1 cells resulted in a 1.6-fold stimulation of p70S6K enzymatic activity at 30 min. Preincubation of the cells with PTX had no effect on AII-dependent activation of p70S6K, consistent with the lack of effect of the toxin on protein synthesis (Fig. 6).

We also measured the activity of MAP kinase in AII-stimulated Rat1- AT_1 cells. Although the precise role of MAP kinases is not known, our recent findings suggest that activation of the MAP kinase pathway is a necessary event for growth factor-induced protein synthesis (56). Fig. 7B shows that AII stimulated the enzymatic activity of p44mapk by 2-fold in Rat1- AT_1 cells. The MAP kinase response was not significantly altered in cells treated with PTX (Fig. 7B). These results demonstrate that AII binding to the human AT_1 receptor activates the two major protein kinase signalling cascades known to be implicated in cell growth.

CONCLUDING REMARKS

In the present study, we have expressed a physiological number of human AT₁ receptors in the Rat1 fibroblast cell line. Radioligand binding studies revealed that the expressed receptor displays the typical pharmacological profile of an AT₁ receptor. We show that the recombinant human AT₁ receptor couples to both PLC activation and adenylyl cyclase inhibition via at least two distinct G proteins. Most importantly, we demonstrate for the first time that activation of the human AT₁ receptor leads to an increased rate of protein synthesis in Rat1-AT₁ cells, without any effect on DNA synthesis or cell proliferation. The hypertrophic response is accompanied by the induction of several early growth response genes and by the activation of the p70S6K and MAP kinase cascades. Interestingly, the effects of AII on the growth of Rat1-AT₁ cells are very similar to the effects observed in vascular SMC. Therefore, the Rat1-AT₁ cell line probably represents the best model system described so far to investigate the physiological effects of AII on cellular hypertrophy and to define the signal transduction pathways mediating this response. The two major advantages of this model are: 1) the possibility to create various mutants of the AT₁ receptor in order to dissect the biochemical events critical for the hypertrophic response; and 2) the easiness of transfection of Rat1 cells in comparison to vascular SMC.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Ronald Smith (Du Pont Merck) and Dr. Joan Keiser (Parke-Davis) for supply of losartan and PD123319, respectively, Elisabeth Pérès for preparation of the figures, and Irène Rémillard for secretarial assistance. We are grateful to Dr. André De Léan and Normand McNicoll for access to their iodination and computer facilities.

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

- 1 Paul, M., Bachmann, J. and Ganten, D. (1992) *Trends Cardiovasc. Med.* **2**, 94-99
- 2 Brooks, D.P. & Ruffolo, R.R.Jr. (1994) in *Angiotensin II Receptors Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Perspectives* (Ruffolo, R.R., Jr. ed.), pp. 71-102, CRC Press, Inc., Boca Raton
- 3 Schelling, P., Fischer, H. and Ganten, D. (1991) *J. Hypertens.* **9**, 3-15
- 4 Pratt, R.E. & Dzau, V.J. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M.K., Phillips, M.I. & Sumners, C. eds.), pp. 471-483, CRC Press, Inc., Boca Raton
- 5 Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. and Smith, R.D. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**, 205-251
- 6 Chiu, A.T., Leung, K.H., Smith, R.D. & Timmermans, P.B.M.W.M. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M.K., Phillips, M.I. & Sumners, C. eds.), pp. 245-271, CRC Press, Inc., Boca Raton
- 7 Chiu, A.T., Roscoe, W.A., McCall, D.E. and Timmermans, P.B.M.W.M. (1991) *Receptor* **1**, 133-140
- 8 Ko, Y., Görg, A., Appenheimer, M., Wieczorek, A.J., Düsing, R., Vetter, H. and Sachinidis, A. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 215-219
- 9 Giasson, E. and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5225-5231
- 10 Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S. and Bernstein, K.E. (1991) *Nature* **351**, 233-236
- 11 Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T. (1991) *Nature* **351**, 230-233

- 12 Inagami, T., Mizukoshi, M. & Guo, D.F. (1994) in *Angiotensin receptors* (Saavedra, J.M. & Timmermans, P.B.M.W.M. eds.), pp. 1-15, Plenum Press, New York
- 13 Catt, K.J., Sandberg, K. & Balla, T. (1993) in *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* (Raizada, M.K., Phillips, M.I. & Sumners, C. eds.), pp. 307-356, CRC Press, Inc., Boca Raton
- 14 Rogers, T.B. and Lokuta A.J., (1994) *Trends Cardiovasc. Med.* **3**, 110-116
- 15 Geisterfer, A.A.T., Peach, M.J. and Owens, G.K. (1988) *Circ. Res.* **62**, 749-756
- 16 Berk, B.C., Vekshtein, V., Gordon, H.M. and Tsuda, T. (1989) *Hypertension* **13**, 305-314
- 17 Sachinidis, A., Ko, Y., Nettekoven, W., Wieczorek, A.J., Düsing, R. and Vetter, H. (1992) *J. Hypertens.* **10**, 1159-1164
- 18 Lyall, F., Morton, J.J., Lever, A.F. and Cragoe, E.Jr. (1988) *J. Hypertens.* **6**, S438-S441
- 19 Dubey, R.K., Roy, A. and Overbeck, H.W. (1992) *Circ. Res.* **71**, 1143-1152
- 20 Lambert, C., Massillon, Y. and Meloche, S. (1995) *Circ. Res.* **77**, 1001- 1007
- 21 Meloche, S., Pagès, G. and Pouysségur, J. (1992) *Mol. Biol. Cell.* **3**, 63-71
- 22 Sanger, F., Knicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- 23 Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7413-7417
- 24 Meloche, S., Ong, H., Cantin, M. and De Léan, A. (1986) *Mol. Pharmacol.* **30**, 537-543

- 25 De Léan, A., Hancock, A.A. and Lefkowitz, R.J. (1982) *Mol. Pharmacol.* **21**, 5-16
- 26 Leduc, I., Haddad, P., Giasson, E. and Meloche, S. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**, 582-592
- 27 Tovey, K.C., Oldham, K.G. and Whelan, J.A.M. (1974) *Clin. Chim. Acta* **56**, 221-234
- 28 Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
- 29 Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O. and Sternweis, P.C. (1991) *Science* **251**, 804-807
- 30 Taylor, S.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G. and Exton, J.H. (1991) *Nature* **350**, 516-518
- 31 Blank, J.L., Ross, A.H. and Exton, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 18206-18216
- 32 Pobiner, B.F., Northup, J.K., Bauer, P.H., Fraser, E.D. and Garrison, J.C. (1991) *Mol. Pharmacol.* **40**, 156-167
- 33 Johnson, M.C. and Aguilera, G. (1991) *Endocrinology* **129**, 1266-1274
- 34 Ouali, R., Poulette, S., Penhoat, A. and Saez, J.M. (1992) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 271-280
- 35 Sadoshima, J.-I. and Izumo, S. (1993) *Circ. Res.* **73**, 424-438
- 36 Bauer, P.H., Chiu, A.T. and Garrison, J.C. (1991) *Mol. Pharmacol.* **39**, 579-585
- 37 Crawford, K.W., Frey, E.A. and Cote, T.E. (1992) *Mol. Pharmacol.* **41**, 154-162

- 38 Poggioli, J., Lazar, G., Houillier, P., Gardin, J.P., Achard, J.M. and Paillard, M. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, C750-C758
- 39 Ohnishi, J., Ishido, M., Shibata, T., Inagami, T., Murakami, K. and Miyazaki, H. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1094-1101
- 40 Sadoshima, J.-I. and Izumo, S. (1994) *Circ. Res.* **73**, 413-423
- 41 Kawahara, Y., Sunako, M., Tsuda, T., Fukuzaki, H., Fukumoto, Y. and Takai, Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 52-59
- 42 Taubman, M.B., Berk, B.C., Izumo, S., Tsuda, T., Alexander, R.W. and Nadal-Ginard, B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 526-530
- 43 Naftilan, A.J., Pratt, R.E., Eldridge, C.S., Lin, H.L. and Dzau, V.J. (1989) *Hypertension* **13**, 706-711
- 44 Naftilan, A.J., Gilliland, G.K., Eldridge, C.S. and Kraft, A. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5536-5540
- 45 Sachinidis, A., Weisser, P., Ko, Y., Schulte, K., Meyer zu Brickwedde, K., Neyses, L. and Vetter, H. (1992) *FEBS Lett.* **313**, 109-112
- 46 Naftilan, A.J., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1419-1424
- 47 Teutsch, B., Bihoreau, C., Monnot, C., Bernstein, K.E., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Corvol, P. and Clauser, E. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1381-1388
- 48 Pouysségur, J. and Seuwen, K. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 195-210
- 49 Moolenaar, W.H. (1991) *Cell Growth Differ.* **2**, 359-364
- 50 Gupta, S.K., Gallego, C. and Johnson, G.L. (1992) *Mol. Biol. Cell.* **3**, 123-128
- 51 Seuwen, K., Magnaldo, I. and Pouysségur, J. (1988) *Nature* **335**, 254-256

- 52 Seuwen, K., Magnaldo, I., Kobilka, B.K., Caron, M.G., Regan, J.W., Lefkowitz, R.J. and Pouyssegur, J. (1990) *Cell Regul.* **1**, 445-451
- 53 Chambard, J.C., Paris, S., L'Allemain, G. and Pouyssegur, J. (1987) *Nature* **326**, 800-803
- 54 van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. and Moolenaar, W.H. (1989) *Cell* **59**, 45-54
- 55 Ferrari, S. and Thomas, G. (1994) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 385-413
- 56 Servant, M.J., Giasson, E. and Meloche, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **271**, 16047-16052

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Pharmacological properties of the recombinant human AT₁ receptor expressed in Rat1 fibroblast cells

Rat1 cells were stably transfected with the human AT₁ receptor gene to generate the Rat1-AT₁ cell line as described in "Experimental Procedures".

(A) Membranes from Rat1 or Rat1-AT₁ cells were incubated for 1 h at 25° C with 0.2 nM ¹²⁵I-sarile in the absence or presence of the non-selective AII receptor antagonist sarile (10⁻⁶ M), the AT₁ selective antagonist losartan (10⁻⁵ M) or the AT₂ selective antagonist PD123319 (3 X 10⁻⁶ M). Bound ¹²⁵I-sarile was determined by rapid filtration on GF/B filters. Binding data are expressed as fmoles of ¹²⁵I-sarile bound per mg of membrane protein. Each value represents the mean +/- S.E. of triplicate determinations.

(B) Saturation binding curve of ¹²⁵I-sarile to Rat1-AT₁ cell membranes. Membranes (50 µg) were incubated for 1 h at 25° C with increasing concentrations of ¹²⁵I-sarile in the absence or presence of 10⁻⁶ M sarile. Bound ¹²⁵I-sarile was determined by rapid filtration on GF/B filters. Data points for each curve were obtained from a single representative experiment with duplicate determination of each point. Binding data were analyzed by non-linear least-squares regression analysis and the solid lines represent the computerized fit of the data.

(C) Competition binding curves of AII analogs for the binding of ¹²⁵I-sarile to Rat1-AT₁ cell membranes. Membranes (50 µg) were incubated with 0.2 nM ¹²⁵I-sarile and varying concentrations of the following competing agents: sarile (O), AII (O), losartan (∇) and PD123319 (∇). Binding data were analyzed as above.

Fig. 2 AII stimulates PLC and inhibits basal and forskolin-stimulated adenylyl cyclase in Rat1-AT₁ cells

(A) Time-course of AII-stimulated IP₃ formation. Quiescent Rat1-AT₁ cells were incubated with 100 nM AII for the indicated periods of time. The intracellular mass of IP₃ was measured by a specific radioreceptor assay as described in "Experimental Procedures".

(B) Effect of PTX on AII stimulation of PLC activity. Quiescent Rat1-AT₁ cells were pretreated for 16 h at 37° C with or without 100 ng/ml PTX. The cells were then stimulated or not (cont) with 100 nM AII for 15 sec. IP₃ content was measured as

above. Each point represents the mean \pm S.E. of three independent determinations performed in duplicate.

(C, D) Quiescent Rat1-AT₁ cells were pretreated for 16 h at 37° C with or without 100 ng/ml PTX. The cells were then incubated for 20 min with 100 nM AII in the absence (panel C) or presence (panel D) of 10 μ M forskolin (F). The intracellular content of cAMP was measured by a specific protein-binding assay as described in "Experimental Procedures".

Fig. 3 Induction of early growth response genes expression by AII in Rat1 cells expressing the human AT₁ receptor

Quiescent Rat1-AT₁ cells were pretreated for 10 min with medium alone or with 10⁻⁵ M losartan. The cells were then stimulated for various times with 100 nM AII. Total cellular RNA was extracted from the cells and analyzed serially by Northern hybridization using the indicated ³²P-labelled probes as described under "Experimental Procedures". The results were normalized by hybridization of the blots with a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe. The extent of hybridization was visualized and quantified by phosphorimaging analysis.

Fig. 4 Activation of the human AT₁ receptor increases the rate of protein synthesis in Rat1-AT₁ cells

Control Rat1 or Rat1-AT₁ cells were made quiescent by incubation in serum-free medium for 24 h. The cells were then stimulated for 24 h with the indicated concentrations of AII. Protein synthesis was measured by ³H-leucine incorporation. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

(A) Quiescent Rat1 or Rat1-AT₁ cells were pretreated for 10 min in the absence or presence of the AT₁ selective antagonist losartan (10⁻⁵ M) or the AT₂ selective antagonist PD123319 (3 X 10⁻⁶ M). The cells were then stimulated with medium (cont) or 100 nM AII for 24 h.

(B) Dose-response curve for the stimulatory effect of AII on protein synthesis in Rat1-AT₁ cells.

Fig. 5 Lack of effect of AII on the rate of DNA synthesis in Rat1-AT₁ cells

Quiescent rat aortic SMC (left panel) or Rat1-AT₁ cells (right panel) were stimulated for 24 h with medium alone (cont), 100 nM AII or 10% calf serum. The specificity of the AII response was determined by preincubating the cells for 10 min with 10⁻⁵ M losartan prior to AII stimulation. DNA synthesis was measured by ³H-thymidine incorporation. Each value represents the mean +/- S.E. of triplicate determinations.

Fig. 6 Effect of PTX on AII stimulation of protein synthesis in Rat1-AT₁ cells

Quiescent rat aortic SMC (left panel) or Rat1-AT₁ cells (right panel) were pretreated for 16 h in the absence or presence of 100 ng/ml PTX. The cells were then stimulated with medium alone (cont) or 100 nM AII for 24 h in the continuous presence of the toxin. Protein synthesis was measured by ³H-leucine incorporation. Each value represents the mean +/- S.E. of triplicate determinations.

Fig. 7 AII stimulates the enzymatic activity of p70^{S6K} and MAP kinase in Rat1-AT₁ cells

Quiescent Rat1-AT₁ cells were pretreated for 16 h in the absence or presence of 100 ng/ml PTX. The cells were then stimulated or not (cont) with 100 nM AII for either 30 min (p70^{S6K} assays) or 5 min (p44^{mapk} assays). The specificity of the AII response was determined by preincubating the cells for 10 min with 10⁻⁵ M losartan prior to AII stimulation.

(A) Enzymatic activity of p70^{S6K}. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with p70^{S6K} antiserum preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The phosphotransferase activity of p70^{S6K} was assayed directly on the immune complexes using an S6 peptide as substrate. The enzymatic activities are expressed as pmoles of phosphate incorporated into the peptide per min per mg of lysate protein and represent the mean +/- S.E. of duplicate determinations.

(B) Enzymatic activity of p44^{mapk}. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with p44^{mapk} antiserum SM1 and the phosphotransferase activity of p44^{mapk} was assayed using MBP as a substrate. The enzymatic activities are expressed as pmoles of phosphate incorporated into the substrate per min per mg of lysate protein. Each value represents the mean +/- S.E. of duplicate determinations.

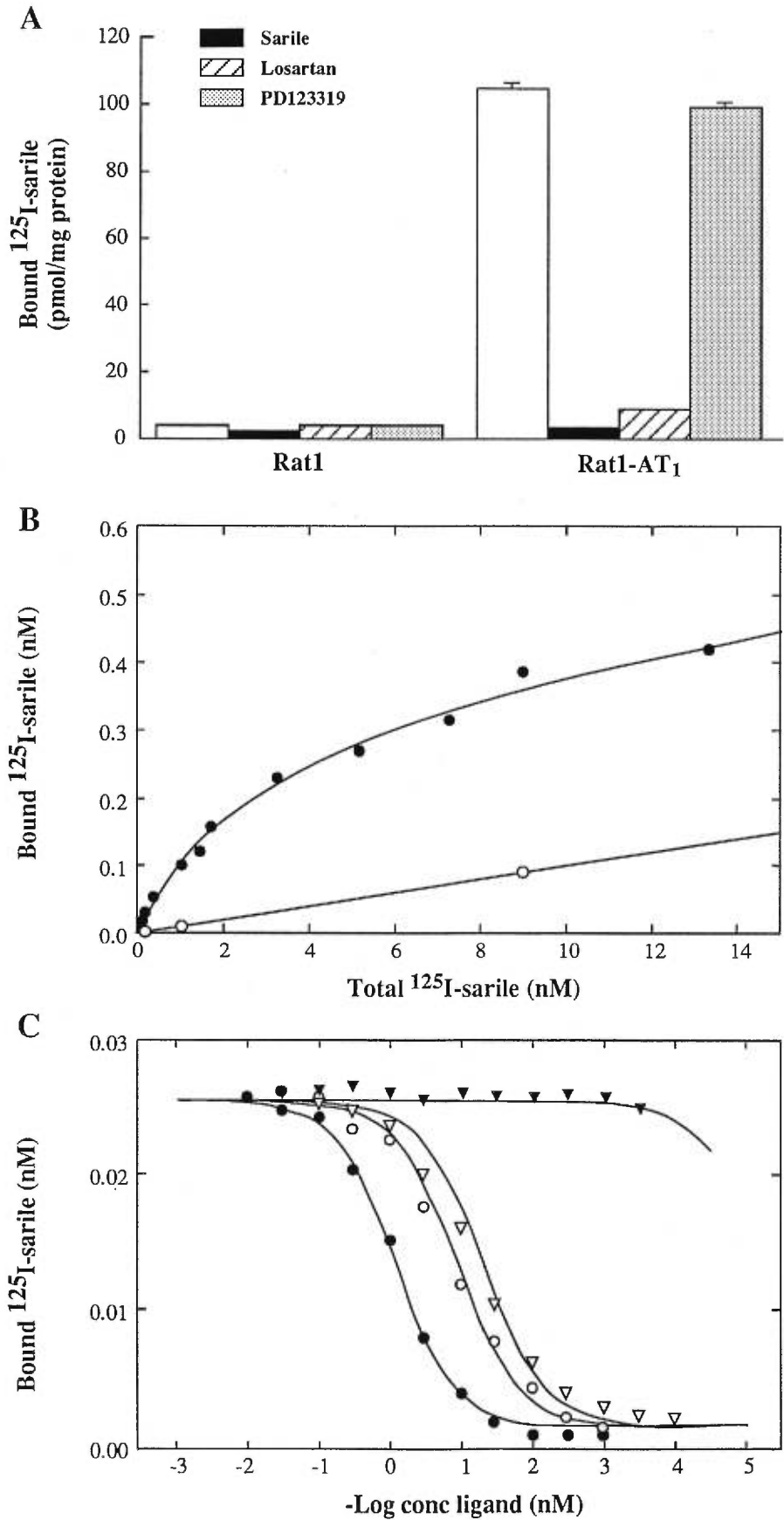


Figure 1

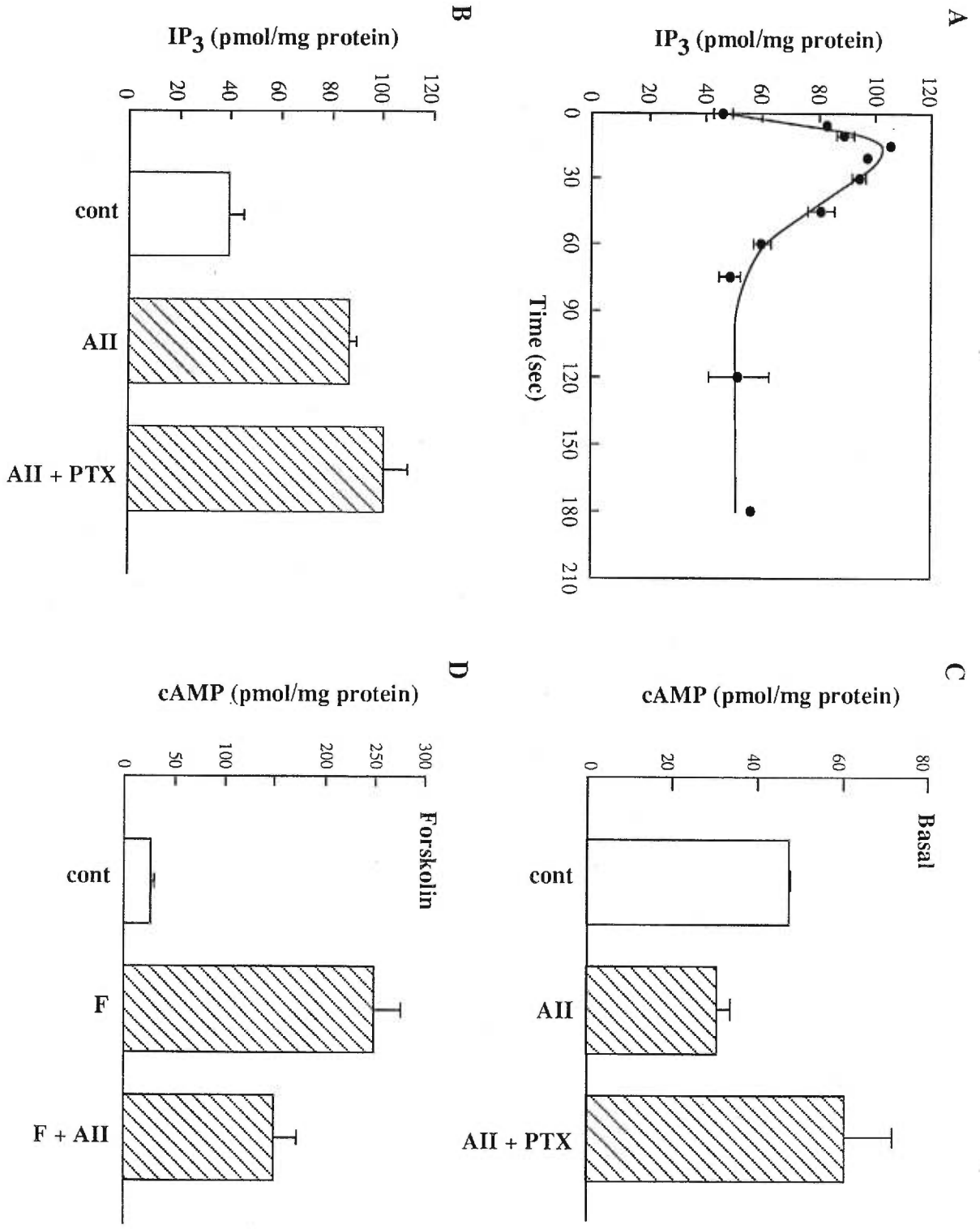


Figure 2

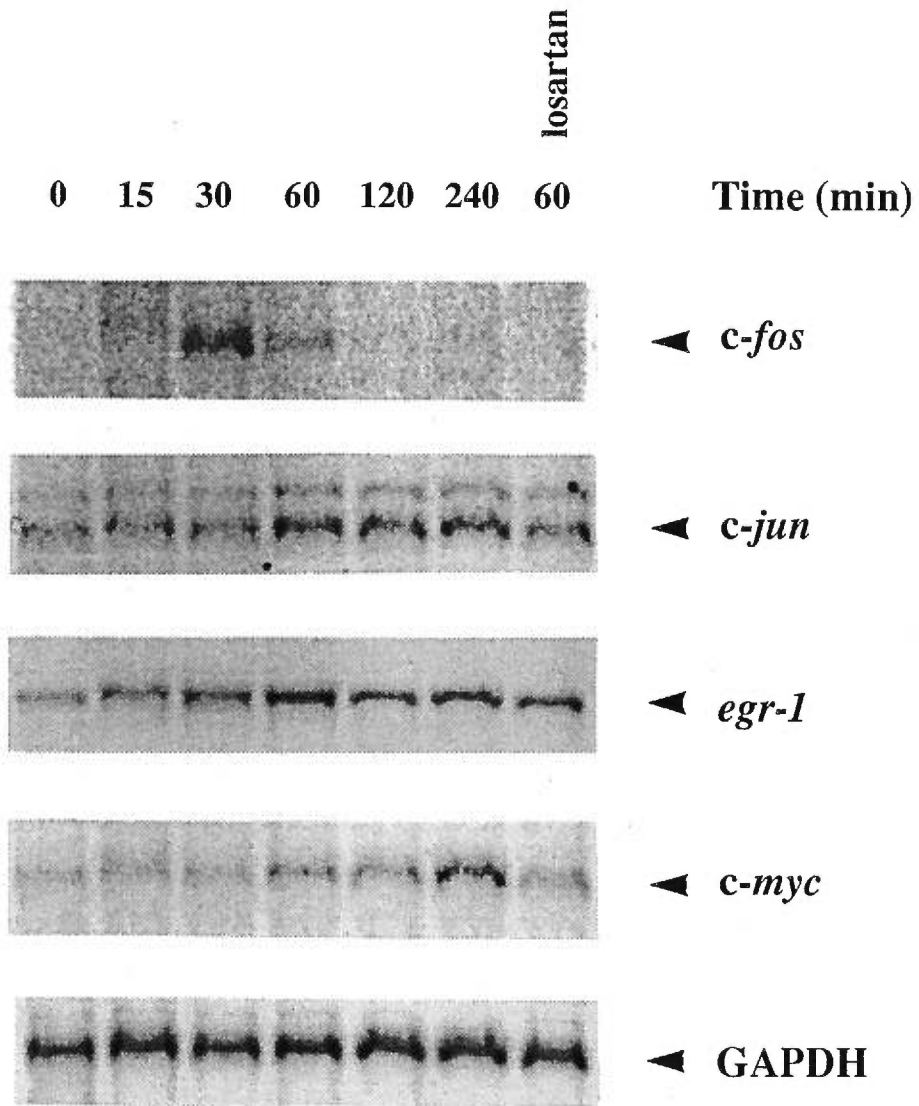


Figure 3

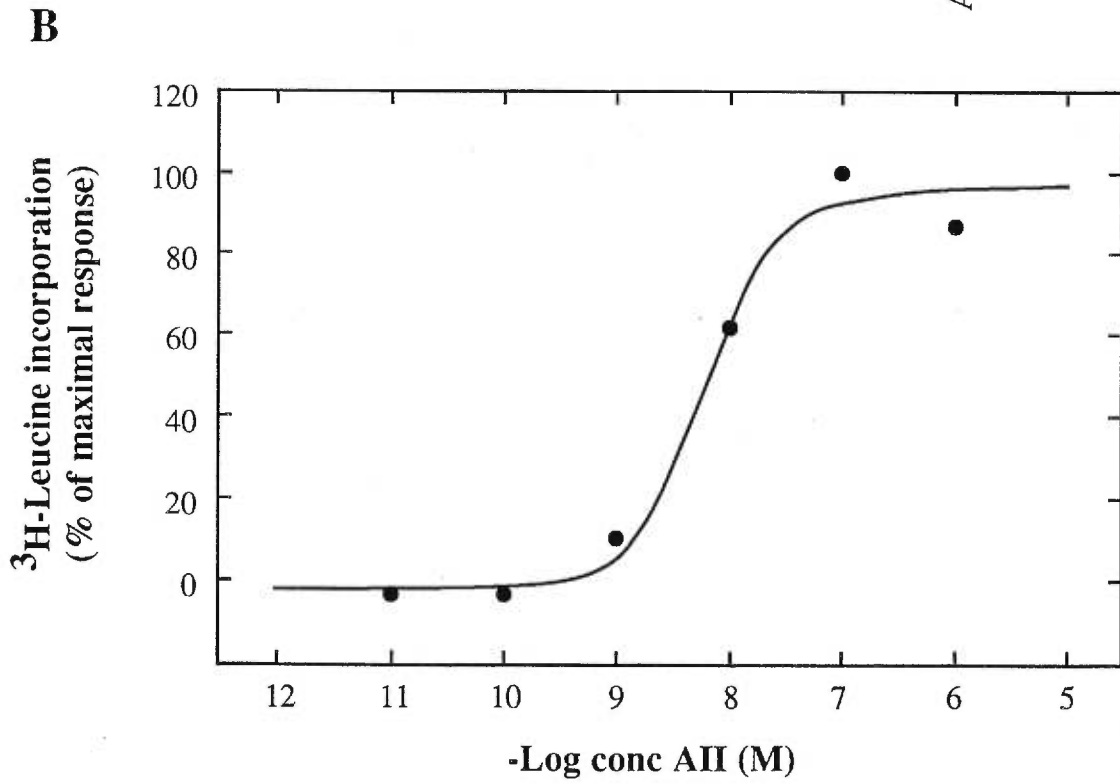
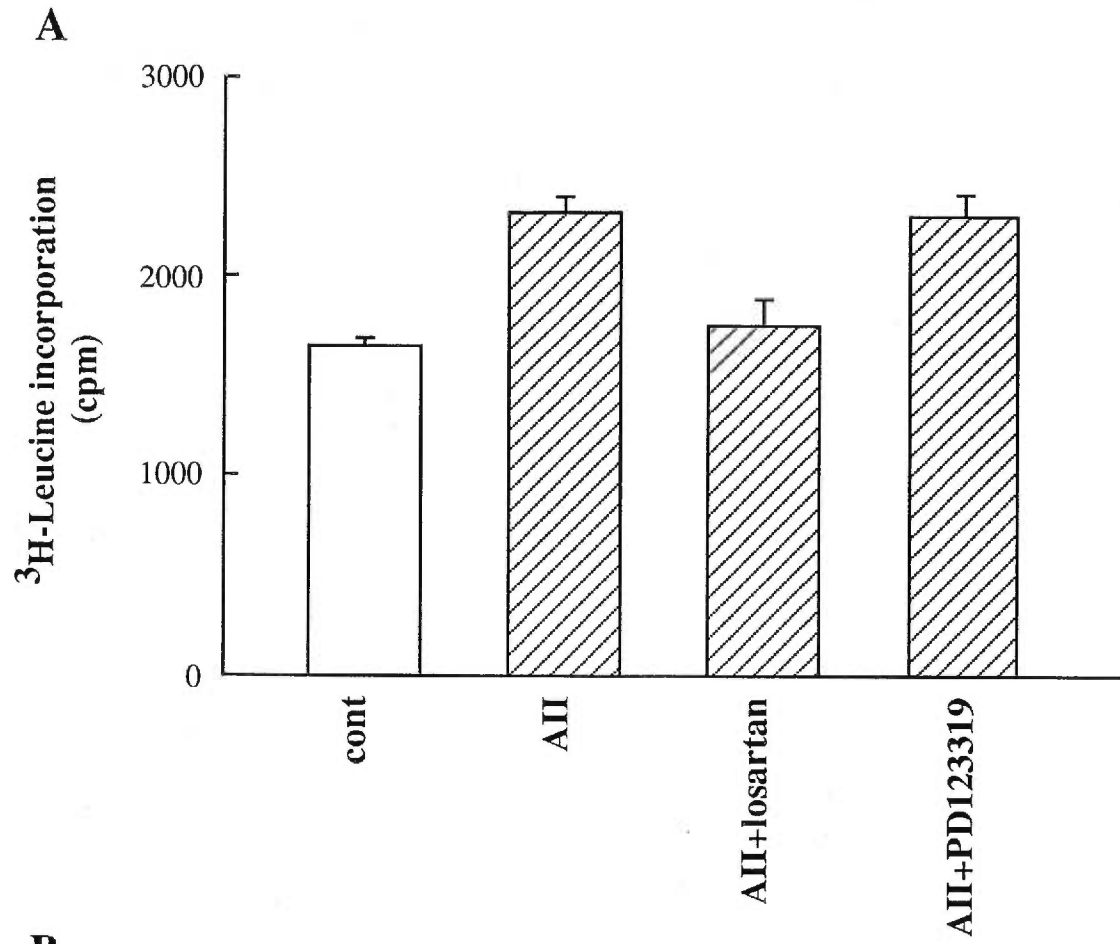


Figure 4

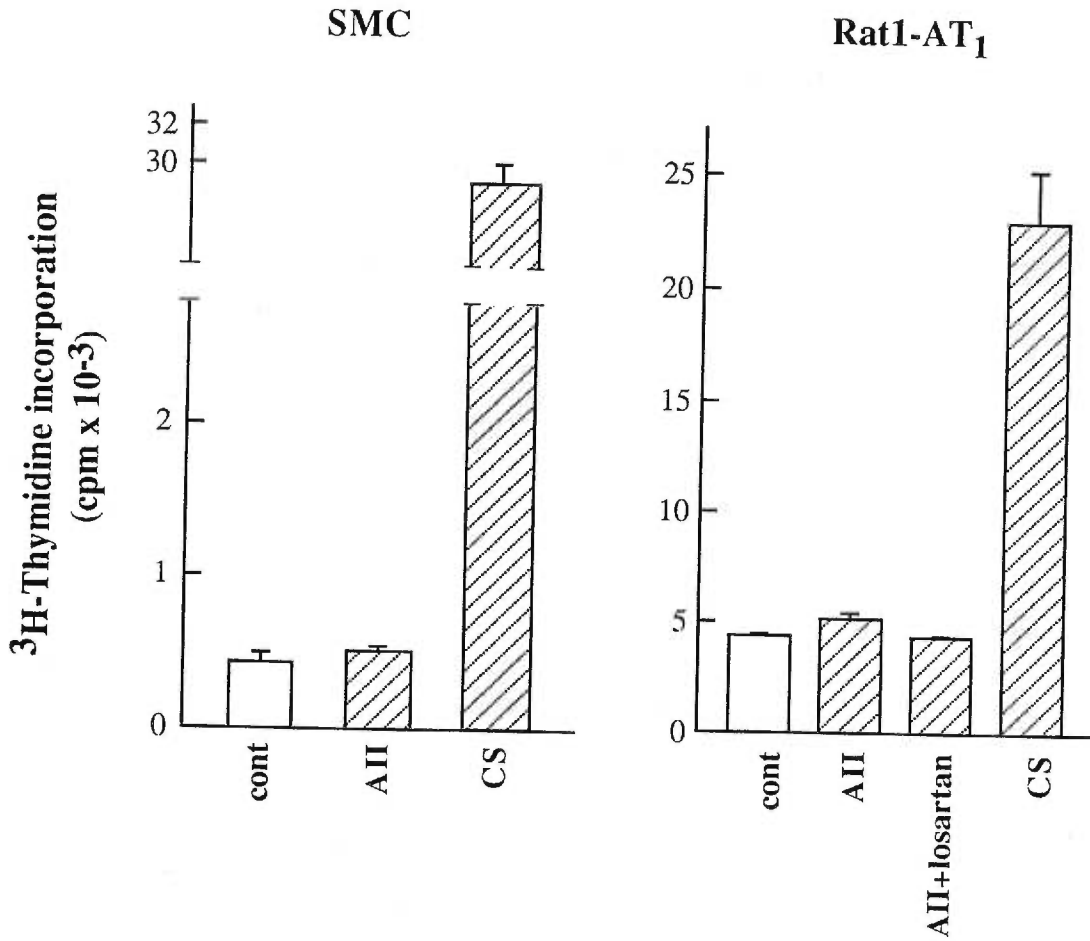


Figure 5

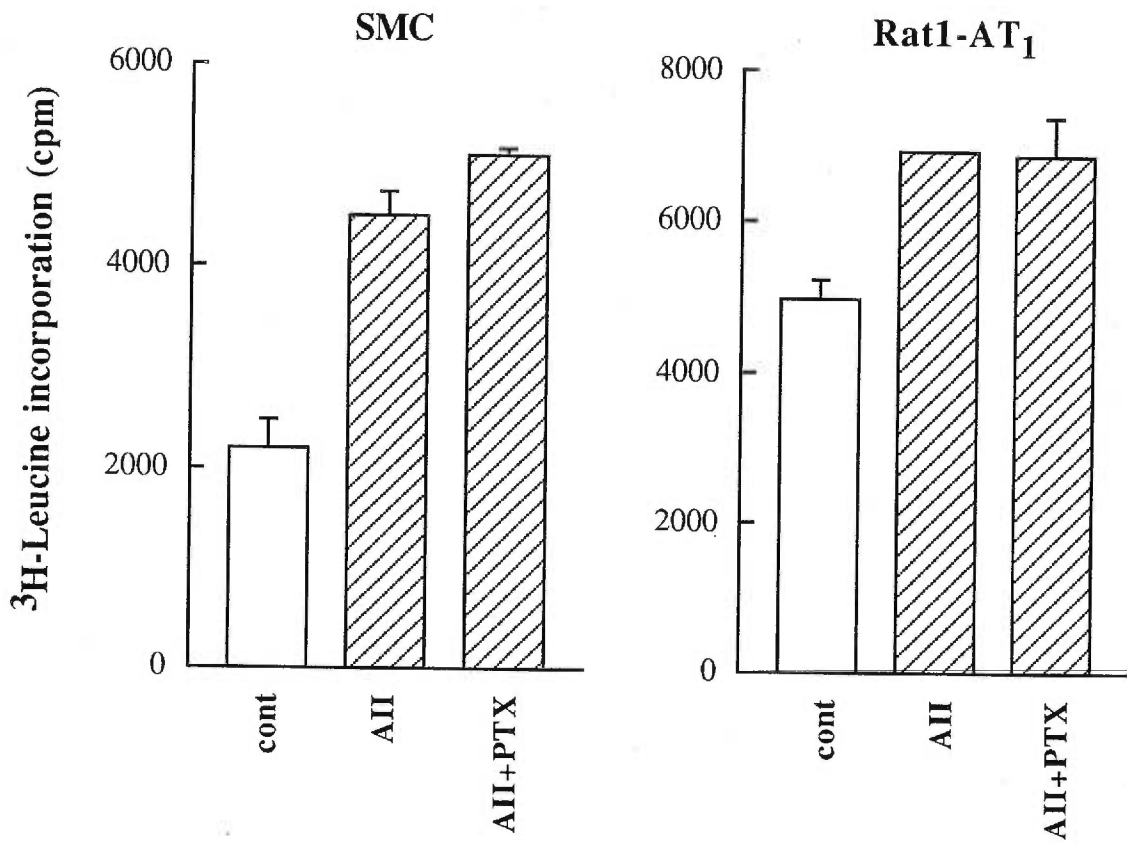


Figure 6

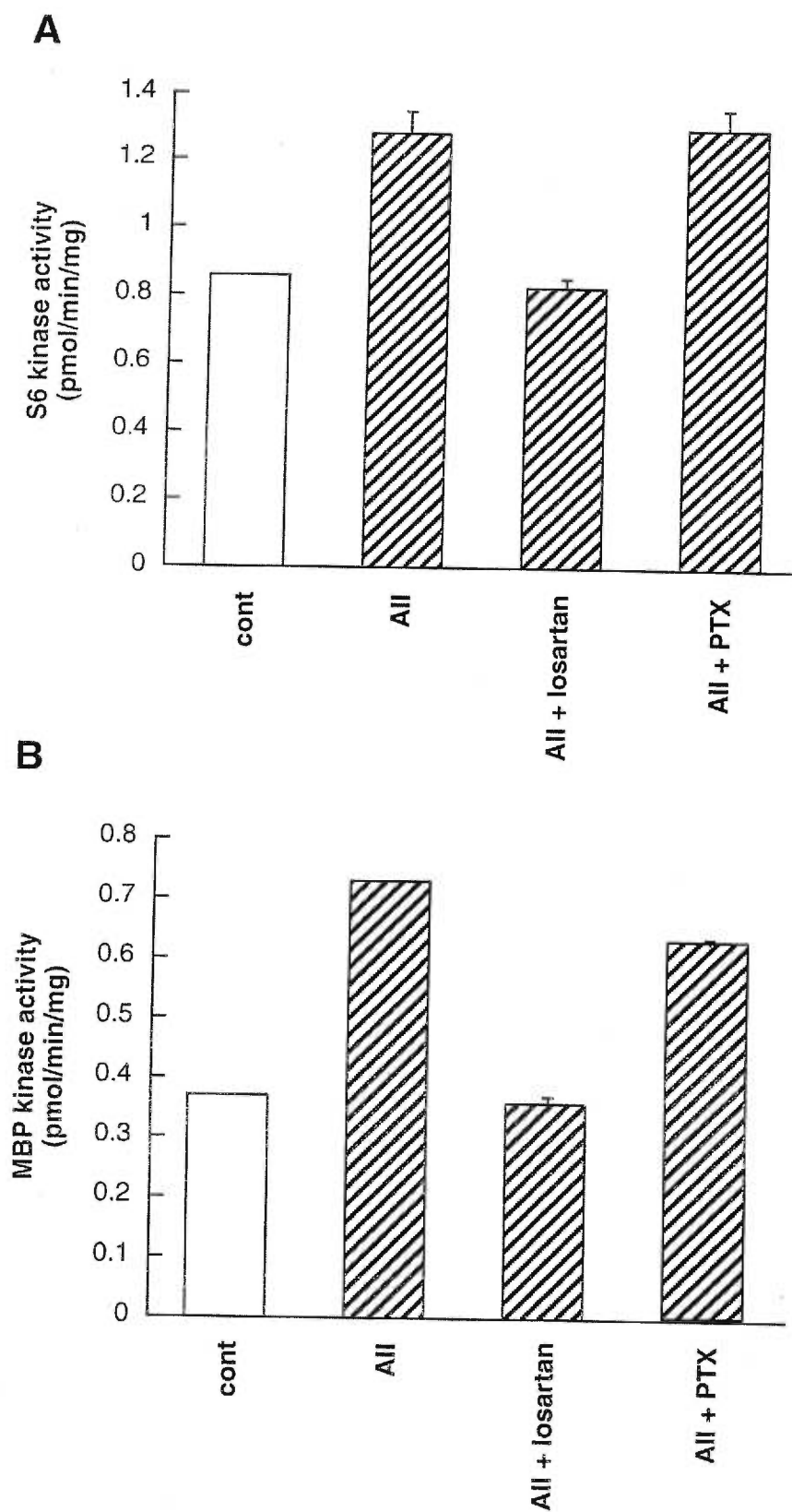


Figure 7

CHAPITRE III

DISCUSSION

Il est facile de constater que, à la lumière des résultats présentés dans l'introduction et ceux présentés sous forme d'articles, la liaison de l'Ang II au récepteur AT_1 induit l'activation de plusieurs voies de signalisation dans les CMLV. Ceci fait de ce complexe hormone-récepteur un des systèmes les mieux caractérisés, non seulement du point de vue physiologique mais également du point de vue des voies de signalisation. Il est cependant important de garder un esprit très critique face aux résultats rapportés par les différentes équipes de recherche lorsque s'impose un résumé de toutes ces voies impliquées dans l'effet hypertrophique du peptide. En effet, les différentes équipes de recherche n'observent pas nécessairement l'activation des mêmes voies (exemple de l'activation de la $PLC\gamma$ par l'Ang II), et l'implication des effecteurs en amont de certaines cascades de signalisation est toujours incertaine et souvent en apparence contradiction entre les différentes équipes de recherche (rôle de tyrosine kinases, des PKCs ou du Ca^{2+} dans l'activation des ERKs par exemple). Or toutes les équipes travaillent avec le même modèle, les CMLV de rat. Ces différences observées sont probablement la résultante de plusieurs facteurs: 1) une question de spécificité liée à la concentration des inhibiteurs pharmacologiques employés ainsi qu'à l'utilisation de certaines techniques. Prenons l'exemple de la génistéine, un inhibiteur des tyrosine kinases. Nous avons démontré que ce dernier n'interfère pas dans l'activation des ERKs par l'Ang II dans les CMLV (Leduc et al., 1995a). Nous utilisons la génistéine à $30\ \mu\text{M}$ car au-delà de cette concentration, les effets de cet inhibiteur sont toxiques pour les CMLV (Leduc et al., 1995a). Or, les équipes qui ont observé un effet de cet inhibiteur sur l'activation des ERKs par l'Ang II ont toutes utilisé cet inhibiteur à une concentration de $100\ \mu\text{M}$ ou plus (Eguchi et al., 1996; Ishida et al., 1998). En ce qui concerne les résultats obtenus grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens (Ishida et al., 1998), ils sont très souvent le reflet d'effets non-spécifiques ou non-antisens, incluant entre autres leur aptitude à causer la dégradation de plusieurs ARN (messagers, ribosomaux...), ou à lier des protéines intracellulaires et membranaires de façon importante (Epstein et al., 1993). L'utilisation d'une approche expérimentale telle que l'incorporation d'anticorps spécifiques contre des protéines de signalisation dans les CMLV par électrochocs (Marrero et al., 1995b) est également discutable car elle s'avère non-reproductible. 2) ces différences peuvent aussi être expliquées par des phénotypes différents des CMLV utilisées par les différentes équipes. Les CMLV sont effectivement isolées de quatre souches différentes de rat. Trois souches de rats normotendus: les Brown Norway, les Spragues Dawley et les Wistar-Kyoto et une souche provient de rats génétiquement hypertendus, les SHR. Des différences importantes de réponse à l'Ang II sont de plus notées sur des CMLV isolées à partir de sujets de même

souche (Sachinidis et al., 1992b). De plus, il est bien connu que plusieurs niveaux de dé-différenciation ont lieu lorsque les CMLV sont placées en culture (Bochaton-Paillat et al., 1996). 3) l'âge des rats lorsque les CMLV sont isolées. Comme cela a été mentionné dans l'introduction, la réponse phénotypique des CMLV à l'Ang II semble varier selon que les cellules proviennent de jeunes rats ou de rat adultes (voir section sur les gènes tardifs dans l'introduction).

Les approches expérimentales doivent donc être toujours évaluées avant de conclure quand à l'implication ou non d'une voie de signalisation dans l'effet hypertrophique du peptide. Afin de répondre à cette question, la meilleure approche expérimentale disponible en ce moment consiste à utiliser des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques (en tenant compte de la concentration utilisée), combinée à des approches de biologie moléculaire: expression d'un dominant négatif ou d'une protéine constitutivement active, approche antisens non pas avec des oligos mais plutôt avec l'ADN codant pour la protéine entière (ADNc), utilisation de CMLV dérivées de souris transgéniques nulles pour certains gènes. Finalement, nous croyons que l'importance d'une voie de signalisation particulière dans les effets hypertrophiques de l'Ang II devrait se refléter par son implication quelle que soit la souche de rats normotendus utilisée.

1.0 Implication de la voie ERK dans l'action hypertrophique de l'Ang II

Une des réponses précoces obligatoire initiée par les facteurs hypertrophiques et mitogéniques est la stimulation de la synthèse protéique qui résulte de modifications transcriptionnelles et traductionnelles (Pardee, 1989; Turla et al., 1991; Kimball et al., 1994). Plusieurs processus de phosphorylation et de déphosphorylation sont essentiels au contrôle de la synthèse protéique (Pardee, 1989; Patton et al., 1995; Proud et Denton, 1997). Des approches biochimiques, pharmacologiques et moléculaires ayant démontré une implication des MAP kinases, et plus spécifiquement du module Raf-MEK-ERK, dans des processus cellulaires complexes comme la prolifération (Kahan et al., 1992; Meloche et al., 1992; Pages et al., 1993; Cowley et al., 1994), ces résultats suggèrent ainsi un rôle potentiel de cette cascade de kinases dans la stimulation globale de la synthèse protéique. C'est grâce au développement d'un inhibiteur spécifique de l'activation de MEK, le PD98059, que nous avons eu la possibilité de démontrer un

rôle essentiel de cette voie de signalisation et ainsi des ERKs dans l'augmentation de la vitesse de synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV. Dans les cardiomyocytes en culture, une approche avec des oligonucléotides antisens dirigés contre les deux isoformes des ERKs suggère probablement une implication importante de cette voie dans les effets hypertrophiques de la phényléphrine (Glennon et al., 1996). Les paragraphes qui suivent décrivent les rôles possibles de cette cascade de signalisation dans la régulation de l'activité des machineries transcriptionnelle et traductionnelle.

1.1 La machinerie transcriptionnelle

Comme mentionné dans l'introduction, les ERKs modulent directement par phosphorylation l'activité de plusieurs facteurs de transcription (Elk-1, c-Fos, c-Myc, etc...). Ces kinases peuvent également phosphoryler d'autres facteurs de transcription comme SRF par exemple et cela de façon dépendante de l'activation d'un intermédiaire appelé MAPKAPK1 (mitogen-activated protein kinase activated protein 1) ou p90^{rsk}. Ces données démontrent ainsi un rôle important des ERKs dans la régulation de la transcription. Cependant, outre le rôle direct de cette voie dans l'induction de *c-fos* par l'Ang II dans les CMLV ou les Rat1-AT₁ (Servant et Meloche, résultats non-publiés), l'activation d'autres gènes restent à préciser. En effet, plusieurs gènes ayant dans leur promoteur l'élément de réponse AP-1 liant les hétérodimères Fos-Jun, laissent entrevoir une fenêtre d'action plus large pour l'implication des ERKs voir même de la famille des MAP kinases dans la transcription de certains gènes dont l' α -actine, la chaîne légère de la myosine, le TGF- β et l'ET-1 (Iwaki et al., 1990; Kim et al., 1990; Lee et al., 1991; Bishopric et al., 1992).

La mise en évidence de voies spécifiques de signalisation et des effecteurs impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle et traductionnelle devrait permettre de comprendre le rôle spécifique de chacune de ces voies. Une approche envisageable afin de répondre à cette question est d'identifier dans un premier temps les protéines dont l'expression est modulée à la hausse après une stimulation des CMLV par l'Ang II, études déjà entreprises par notre équipe et d'autres (Turla et al., 1991; Patton et al., 1995). Dans un deuxième temps, il s'agira de vérifier le rôle de la transcription, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de cette dernière comme l'actinomycine D ou l' α -amanitine. Après avoir identifié les protéines dont l'augmentation de l'expression est dépendante de la transcription, l'utilisation d'approches

pharmacologiques (inhibiteurs) et /ou moléculaires (expression d'un dominant négatif par exemple) permettra de déterminer quelles sont les voies de signalisation stimulées par l'Ang II et impliquées dans l'activation de certains gènes et/ou la stabilisation des ARNm (études accomplies par analyse Northern combinée au "nuclear run-on"). Finalement, la caractérisation moléculaire et biochimique des promoteurs des ces gènes permettra d'apprécier le lien entre l'activation de certaines voies de signalisation et l'implication de facteurs de transcription. Ce genre d'étude a été en partie accomplie par l'équipe de Gary Owens, sur l'induction de l'expression de l' α -actine par l'Ang II dans les CMLV (Hautmann et al., 1997). Cette équipe a ainsi démontré que ce peptide induit une expression importante de l' α -actine en corrélation avec une augmentation importante de l'ARNm correspondant (Turla et al., 1991). Cette augmentation de l'ARNm codant pour l' α -actine n'est pas due à une stabilisation du messager par l'Ang II mais bien à une augmentation de transcription (Hautmann et al., 1997). L'étude du promoteur du gène codant pour l' α -actine démontre que les premières 155 paires de base du promoteur du gène sont suffisantes pour conférer une réponse maximale à l'Ang II. C'est dans cette région que les auteurs ont identifié deux boîtes CArG liant le facteur de transcription SRF de façon dépendante de l'Ang II et activant la transcription du gène. Finalement, la liaison du SRF aux éléments de réponses CArG semble dépendre de l'induction de l'expression d'un autre facteur de transcription de type MHox (Hautmann et al., 1997). D'autres mécanismes peuvent influencer la liaison du SRF aux éléments de réponses sur les promoteurs: la disponibilité même de ce facteur de transcription (sa synthèse de novo par exemple), ou des modifications d'ordre post-traductionnelles comme sa phosphorylation par p90^{rsk}. Ces résultats laissent donc la porte ouverte à la caractérisation des différentes voies de signalisation que l'Ang II active afin d'augmenter la liaison du SRF aux éléments CArG du gène de l' α -actine. L'implication de ce facteur de transcription suggère néanmoins déjà une voie potentielle dans l'activation du gène de l' α -actine: les ERKs.

1.2 La machinerie traductionnelle

L'implication des ERKs dans la régulation de la machinerie traductionnelle reste cependant encore à démontrer de façon définitive. En effet, plusieurs données démontrent aujourd'hui que l'activation de la voie PI3-kinase, et celle de la plupart des effecteurs en aval de cette dernière (AKT, p70^{s6k} et mTOR), est indépendante de l'activité des ERKs (Proud et Denton, 1997). Un lien entre les ERKs et la machinerie traductionnelle avait été évoqué, suite à la publication de plusieurs articles proposant les

4E-BPs comme substrats physiologiques potentiels des ERKs (Haystead et al., 1994; Lin et al., 1994; Méthot et al., 1994). Bien que *in vitro* la phosphorylation de 4E-BP1 par ERK2 diminue l'affinité de ce répresseur traductionnel pour eIF4E (Lin et al., 1994), les résultats de notre groupe et ceux de l'équipe de Georges Thomas démontrent clairement (par l'utilisation du PD98059, la comparaison des cinétiques d'activation des ERKs et de la phosphorylation de 4E-BP1, et l'analyse de cartes peptidiques de 4E-BP1 phosphorylé *in vivo* ou *in vitro*) que les ERKs ne sont pas impliquées *in vivo* dans la régulation de la phosphorylation de 4E-BP1 (von Manteuffel et al., 1996; Fleurent et al., 1997).

Comme cela est rappelé dans l'introduction, la protéine kinase GSK-3 est un substrat de p90^{rsk} *in vitro*. La kinase GSK-3 est un effecteur négatif de la traduction car elle phosphoryle et inhibe ainsi l'activité de eIF2B, un facteur d'échange guanylique jouant un rôle critique dans l'initiation de la traduction en permettant le recyclage de eIF2 (Redpath et Proud, 1994). En phosphorylant GSK-3, p90^{rsk} inhibe l'activité kinase de cette dernière *in vitro*. Cette observation suggère ainsi un rôle des ERKs, par l'intermédiaire de p90^{rsk}, dans l'activation des mécanismes cellulaires conduisant à l'initiation de la traduction. Ce lien entre les ERKs et la machinerie traductionnelle n'est cependant qu'une hypothèse car il n'existe aucune preuve d'un tel mécanisme *in vivo*. De plus, GSK-3 est également un substrat pour la p70^{s6k} et PKB *in vitro*, et des données récentes suggèrent plutôt que PKB serait la kinase phosphorylant et inactivant GSK-3 *in vivo*. Effectivement, l'utilisation de la rapamycine et du PD98059 n'empêchent pas l'inactivation de GSK-3 par l'insuline, alors que la wortmannin, un inhibiteur de la PI3-kinase située en amont de PKB, le fait (Proud et Denton, 1997).

Bien qu'un rôle des ERKs, par l'intermédiaire des 4E-BPs et p90^{rsk}, soit peu probable dans les mécanismes contrôlant la traduction, l'identification d'un nouvel effecteur des ERKs est cependant prometteuse. Cet effecteur est la kinase MNK1 dont l'activité enzymatique est modulée positivement suite à une phosphorylation par les ERKs (Fukunaga et Hunter, 1997; Waskiewicz et al., 1997). Cette sérine/thréonine kinase phosphoryle le facteur eIF4E *in vitro* (voir plus haut et Fig. 3) et augmente probablement ainsi son activité en tant qu'initiateur de la traduction *in vivo*, bien que cela reste à prouver (Waskiewicz et al., 1997). La découverte de cet effecteur important qu'est MNK1 démontre que l'activation des ERKs pourrait également contrôler la traduction coiffe-dépendante des ARNm. En ce sens, des résultats préliminaires très intéressants de notre groupe démontrent que l'Ang II induit une activation de MNK1

ainsi que la phosphorylation de eIF4E *in vitro* (Voisin et Meloche, résultats non-publiés). Une façon élégante de démontrer un rôle *in vivo* des ERKs dans la traduction coiffe-dépendante stimulée par l'Ang II serait l'introduction (par l'utilisation de rétrovirus) d'un vecteur codant pour un ARNm bicistronique dans les CMLV. Cet ARNm est composé de deux ARNm (voir figure 7): un codant pour la chloramphénicol acetyltransferase (CAT) dont la traduction est coiffe-dépendante et l'autre, la luciférase (LUC), qui est précédé d'un site d'entrée interne des ribosomes (IRES) dont la traduction est coiffe-indépendante (Pause et al., 1994; Beretta et al., 1996). L'activité de CAT et de la luciférase étant facilement quantifiable, il nous sera donc possible dans un premier temps de vérifier l'importance de la traduction coiffe-dépendante par l'Ang II dans les CMLV et dans un deuxième temps, le rôle de la voie ERK dans ce processus grâce à l'utilisation du PD98059.



Figure 7: construction pGEMCAT/pol/LUC (tiré de la référence "PAUSE et al., 1994")

Bien que nous ayons démontré une implication essentielle des ERKs dans l'effet hypertrophique de l'Ang II, des résultats de notre groupe suggèrent que cette voie n'est cependant pas suffisante. En effet, l'utilisation du PD98059 n'inhibe pas totalement la synthèse protéique induite par l'Ang II (inhibition de 70 à 80%; voir article dans la section résultats). De plus, comme cela a été mentionné dans l'introduction, deux autres voies distinctes de l'activation des ERKs sont également impliquées de façon importante dans les effets du peptide. Il s'agit de la voie de la p70^{s6k} (Giasson et Meloche, 1995) et des tyrosine kinases (Leduc et al., 1995a). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de chacune de ces voies (rapamycine pour la p70^{s6k}, le PD98059 pour les MEKs et donc les ERKs ainsi que la génistéine et l'herbimycine A pour les tyrosine kinases) démontre que ces trois voies sont distinctes les unes des autres mais cependant toutes impliquées dans l'action trophique de l'Ang II. La rapamycine, comme le PD98059, n'inhibe pas totalement les effets hypertrophiques de l'hormone (environ 70% d'inhibition), alors que la génistéine et

l'herbimycine A inhibent totalement l'action de l'Ang II sur la synthèse protéique. En accord avec ces résultats, nous avons démontré que l'utilisation combinée de la rapamycine et du PD98059 a des effets additifs sur l'inhibition de la synthèse protéique, indiquant ainsi que plusieurs voies distinctes sont recrutées par le récepteur AT₁ afin d'induire un effet hypertrophique dans les CMLV. Ces résultats sont également compatibles avec le modèle de l'insuline qui, comme il a été mentionné dans l'introduction, active plusieurs kinases dont des tyrosines kinases et les voies de la PI3-kinase et les MAP kinases ERKs afin d'induire la synthèse protéique dans les cellules cibles.

1.3 Application clinique

Dans la plupart des modèles la voie p21^{ras} est empruntée afin d'activer le module Raf-MEK-ERK. Comme mentionné dans l'introduction, bien que l'Ang II active p21^{ras}, son rôle dans la signalisation activée par l'Ang II est encore obscur et discutable car l'expression d'une forme dominante négative de p21^{ras} dans les CMLV inhibe l'activation de p21^{ras} par l'Ang II mais n'interfère pas avec l'activation des ERKs et la synthèse protéique induite par l'Ang II (Takahashi et al., 1997a). Ces résultats suggèrent que l'activation des ERKs par l'Ang II n'est pas dépendante de p21^{ras} dans les CMLV et indiquent que, même si p21^{ras} se retrouve en amont de certaines voies de signalisation impliquées dans l'action trophique du peptide, comme la PI3-kinase par exemple (voir introduction), l'activation de ces voies par l'Ang II peut également se faire d'une façon indépendante de p21^{ras}. Ces résultats sont néanmoins en apparente contradiction avec le rôle important qui lui a été attribué en tant que modulateur de la croissance cellulaire et cela, autant dans les cellules normales que transformées (Feramisco et al., 1984; Stacey et Kung, 1984; Bourne et al., 1991; Boguski et McCormick, 1993). Prenons comme exemple la resténose post-angioplastie. Il a été clairement démontré que les inhibiteurs de l'ACE, ou des antagonistes du récepteur AT₁, inhibent la prolifération néointimale après angioplastie de l'artère carotide chez le rat (Powell et al., 1989; Laporte et Escher, 1992), d'où le rôle important de l'Ang II dans les processus cellulaires conduisant à la prolifération incontrôlée des CMLV chez l'animal. Une autre façon de bloquer la resténose post-angioplastie est d'inactiver p21^{ras} dans les CMLV par l'utilisation d'une solution de gel pluronique administrant localement un dominant négatif de la protéine après l'angioplastie (Indolfi et al., 1995). Ces résultats très intéressants démontrent donc un rôle important de p21^{ras} comme intégrateur des signaux extracellulaires présents lors de

l'angioplastie. Ceci suggèrent, de façon indirecte cependant, que l'Ang II utilise fort probablement cet intégrateur, et donc la voie des ERKs, dans le phénomène de croissance exagérée des CMLV chez l'animal. Ainsi, il serait intéressant d'inhiber l'activité des ERKs chez l'animal afin d'en évaluer leur rôle. Cependant, à l'heure actuelle l'utilisation du PD98059 n'est possible que pour des études *in vitro* car ce composé est peu soluble et s'avère très toxique chez l'animal.

2.0 L'AMPC, un antagoniste physiologique de l'action hypertrophique de l'Ang II

L'observation que des agents augmentant la teneur en AMPc intracellulaire ont également une action antagoniste sur l'effet trophique de l'Ang II est à la fois intéressante et pratique. Intéressante car cet effet est spécifique de certaines voies de signalisation activées par l'Ang II. De plus, cet effet est observé non seulement dans les CMLV mais également dans le modèle Rat1-AT₁. Pratique, car la spécificité de l'action de l'AMPC sur certaines protéines pourra permettre d'étudier plus précisément le rôle de ces dernières dans les effets trophiques de l'hormone.

Des effets similaires à l'élévation de l'AMPC ont été observés par notre groupe lors de l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosine kinases (génistéine et l'herbimycine A, voir plus haut). Cependant, contrairement à ces inhibiteurs généraux des tyrosine kinases, l'augmentation en AMPc (après un traitement à l'IBMX et la forskoline) inhibe spécifiquement la phosphorylation sur tyrosine de la paxilline et de la kinase TYK2 après une stimulation des CMLV par l'Ang II, sans toutefois influencer celle des ERKs, de Shc, de FAK et de PYK2. De plus, les propriétés pharmacologiques du récepteur AT₁, la production d'InsP₃, l'activité kinase des deux isoformes des ERKs ainsi que l'expression du gène *c-fos* ne sont pas affectées suite aux traitements forskoline/IBMX et génistéine/herbimycine A (Leduc et al., 1995a). Ceci démontre la spécificité d'action de ces composés sur les tyrosine kinases et probablement l'absence d'implication de ces kinases dans l'activation de voies en aval comme les ERKs par exemple.

Ayant mis en évidence une implication importante de la p70^{s6k} et des ERKs dans l'effet hypertrophique de l'hormone (Giasson et Meloche, 1995), il était concevable que les effets antagonistes d'une élévation de l'AMPC puissent s'expliquer

par une diminution d'activité de ces voies de signalisation. Nous avons cependant démontré que cela n'était pas le cas. En effet, que ce soit en présence d'IBMX ou de forskoline, l'activation des ERKs par l'Ang II n'est pas affectée. Ces résultats se reflètent sur la phosphorylation sur tyrosine de ces kinases mais également sur l'induction du gène *c-fos* par l'Ang II (Leduc et al., 1995a, voir section résultats) pour laquelle il a été démontré que la voie des ERKs est fortement impliquée (voir introduction). L'activation de la p70^{s6k} par l'Ang II n'est également pas modifiée après un traitement à la forskoline ou à l'IBMX. Ces résultats indiquent que l'effet d'une élévation en AMPc, et donc probablement que l'activation de la PKA, ne module pas négativement les mécanismes moléculaires précoces impliqués dans l'activation de la p70^{s6k} et des ERKs. Ces résultats, et ceux obtenus grâce à l'utilisation de la génistéine et de l'herbimycine A, indiquent donc que l'activation de ces kinases (p70^{s6k} et ERKs) n'est pas suffisante afin d'induire l'augmentation de la vitesse de synthèse protéique par l'Ang II dans les CMLV. Il est cependant important de noter que des concentrations plus fortes de génistéine (100 µM au lieu de 30 µM) et d'IBMX (0.3 mM au lieu de 0.1 mM) inhibe partiellement l'activation des ERKs par l'Ang II (Giasson et Meloche, résultats non-publiés). Ceci indique que certaines tyrosine kinases, moins sensibles à l'effet de ces drogues, sont peut-être situées entre le récepteur AT₁ et la voie des ERKs.

Le rôle pharmacologique des inhibiteurs des tyrosine kinases est bien caractérisé. La génistéine est un dérivé isoflavone qui agit en tant qu'un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP à la kinase (Akiyama et al., 1987) alors que l'herbimycine A est un antibiotique de la classe des benzoquinoides qui lie les groupements réactifs sulfhydryl des tyrosine kinases (Uehara et al., 1989). Ces deux inhibiteurs ont un spectre d'action assez large incluant des tyrosine kinases membranaires et cytoplasmiques. Le rôle de l'AMPc dans l'inhibition de l'activité de certaines tyrosine kinases reste cependant à préciser. En effet, les effets pharmacologiques d'une élévation de la teneur en AMPc sont relayés fort probablement par une activation importante de la PKA, et peu d'informations sont à ce jour disponibles sur l'implication de cette kinase comme modulateur de l'activité de certaines tyrosine kinases. Des expériences seront donc entreprises sous peu afin de vérifier l'implication de cette kinase dans les mécanismes conduisant à l'activation de tyrosine kinases comme TYK2 dans les CMLV. La voie JAK/STAT semble effectivement importante car l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de JAK2 (un homologue de TYK2), le AG490, inhibe la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV (voir figure 8, page 193). Ces résultats préliminaires intéressants démontrent que la

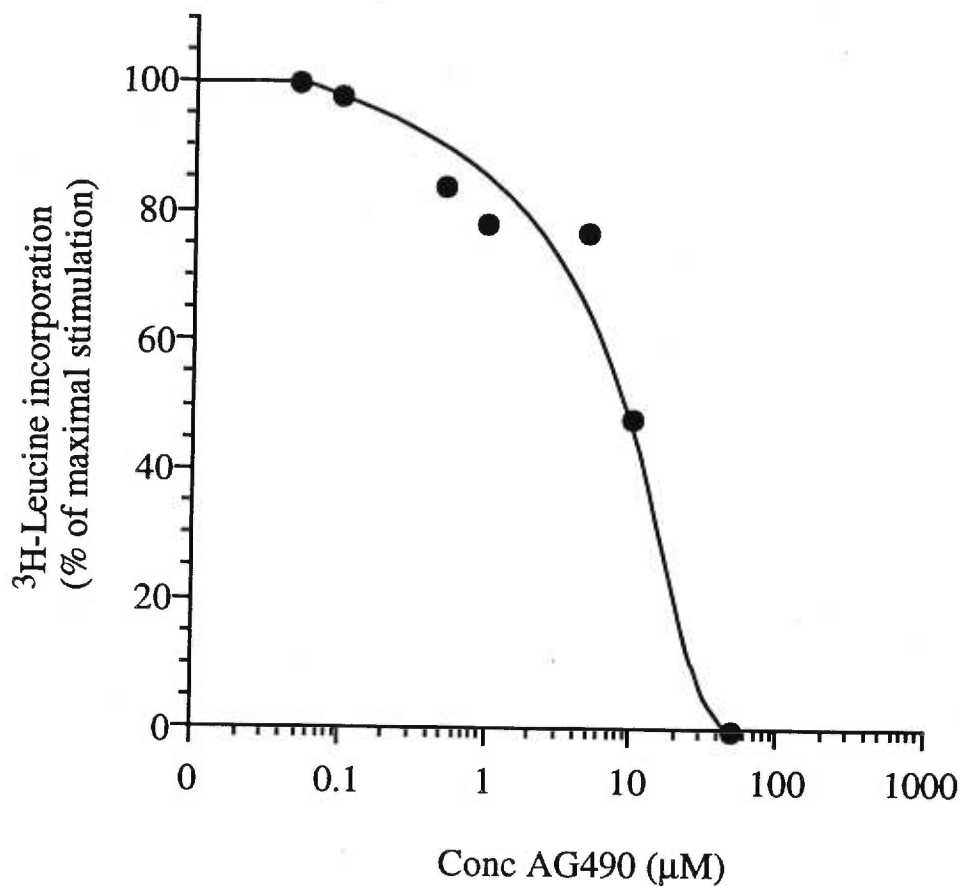


Figure 8: Le AG490 inhibe la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV. Les CMLV de rat ont été incubées dans un milieu sans sérum pendant 48 heures. Ces cellules ont été par la suite pré-traitées pendant 30 min avec les concentrations indiquées de AG490 et stimulées par la suite avec 100 nM Ang II en présence continue de l'inhibiteur pendant 24 heures. La synthèse protéique est mesurée par incorporation de [³H]leucine.

voie JAK/STAT est recrutée par le récepteur AT₁ afin d'induire l'action hypertrophique de l'Ang II dans les CMLV.

2.1 Application clinique

Comme décrit dans l'introduction et la section précédente, l'Ang II est impliquée de façon importante dans la resténose post-angioplastie chez le rat. Nous avons également mentionné que des résultats très intéressants démontrent un rôle important de p21^{ras} en tant qu'intégrateur de signaux extracellulaires présents lors de l'angioplastie (Indolfi et al., 1995). Récemment, la même équipe démontrait qu'une élévation en AMPc, soit par l'administration directe d'AMPc, soit grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de phosphodiésterases, inhibait la formation de la néointima *in vivo* suivant l'angioplastie ainsi que la prolifération de CMLV *in vitro* (Indolfi et al., 1997). L'utilisation combinée d'un inhibiteur pharmacologique de la PKA a renversé les effets bénéfiques d'une élévation de l'AMPc sur la resténose post-angioplastie, démontrant le rôle essentiel et suffisant de cette kinase. Ces résultats démontrent une fois de plus un rôle important de la PKA en tant que modulateur négatif de la croissance des CMLV *in vivo* et *in vitro* et suggèrent, selon nos résultats, une implication des tyrosine kinases dans les effets antagonistes de la PKA sur la croissance des CMLV.

3.0 p27^{Kip1}: un facteur important dans la réponse phénotypique des CMLV

Comme mentionné dans l'introduction, les CMLV sont dotées d'une grande plasticité qui leur permet, selon la présence de stimuli appropriés, d'acquérir un phénotype particulier. Cette plasticité est observée *in vivo* lors du développement du système vasculaire et sous certaines conditions pathologiques comme l'hypertension et l'athérosclérose. Elle s'observe également *in vitro* lors de la mise en culture des CMLV. Peu d'études ont cependant entrepris la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de l'hypertrophie ou de l'hyperplasie des CMLV. Néanmoins, la caractérisation des effecteurs du cycle a permis à notre équipe de démontrer le rôle important de p27^{Kip1} dans la réponse phénotypique des CMLV. Ainsi, nos résultats démontrent que le degré d'expression de p27^{Kip1} est inversement proportionnel à la capacité d'une hormone à induire la synthèse d'ADN. En effet, le PDGF-BB induit une diminution importante de l'expression de p27^{Kip1}, accompagnée d'une activation de Cdk2 et d'une augmentation de la vitesse de synthèse d'ADN. Pour

ce qui est de l'Ang II, ce dernier est incapable d'abaisser le niveau d'expression de p27^{Kip1}, donc d'activer Cdk2 par phosphorylation et d'induire une transition des cellules vers la phase S. Bien que p27^{Kip1} soit également un inhibiteur de Cdk4, nos résultats démontrent que, malgré le fait que l'Ang II soit incapable de diminuer l'expression de cet inhibiteur, cette hormone induit une activation de Cdk4 dans les CMLV. Ces résultats plutôt inattendus sont cependant en accord avec ceux de l'équipe de Massagué qui démontrait récemment la présence de complexes p27^{Kip1}-cycline D-Cdk4 actifs alors que des complexes similaires de p27^{Kip1} avec cycline A-Cdk2 étaient essentiellement inactifs (Blain et al., 1997). Des résultats similaires sont également observés par plusieurs autres équipes (Zhang et al., 1994; Poon et al., 1996; Soos et al., 1996; Vlach et al., 1996). Ces observations suggèrent fortement que p27^{Kip1} est l'inhibiteur physiologique de Cdk2 alors que le rôle des complexes cycline D-Cdk4 serait, entre autre, de servir de réservoir d'inhibiteur. Par exemple, le traitement de certains types cellulaires au TGF- β diminue l'expression de Cdk4 et augmente celle de p15^{Ink4B}, permettant ainsi la libération de p27^{Kip1} des complexes cycline D-Cdk4 (Reynisdottir et al., 1995; Sherr et Roberts, 1995 et voir la section introduction). Si nous nous rapportons à la Fig. 5, nos résultats indiquent donc que l'Ang II induit une progression des CMLV en G₁ (probablement près du point "R"), puisqu'il y a activation de Cdk4. Le passage de ce point demande cependant une activation importante de Cdk2, ce que ne fait pas cette hormone.

D'autres études récentes démontrent également un rôle de p27^{Kip1} dans l'inhibition de la prolifération des CMLV *in vitro*, par exemple lors de leur exposition au collagène polymérisé (surexpression de p27^{Kip1} par activation des intégrines) (Koyama et al., 1996). Un rôle important pour p27^{Kip1} a également été proposé dans la régulation de la croissance des CMLV dérivées soit de la veine saphène (VS), soit des artères mammaires internes (AMI). Pour des patients souffrant d'occlusions coronariennes, la chirurgie est souvent obligatoire et cette dernière consiste à remplacer les artères obstruées par de nouveaux vaisseaux d'origine veineuse ou artérielle. Cependant, après l'intervention, il y a occlusion dans 50% des transplantations d'origine veineuse. Cette observation a poussée l'équipe de Lüscher à vérifier le comportement de CMLV d'origine veineuse (VS) ou artérielle (AMI) face à un facteur de croissance comme le PDGF-BB *in vitro*. Alors que le PDGF-BB induit la synthèse d'ADN et la division cellulaire dans les CMLV d'origine veineuse (VS), ce dernier n'a aucun effet sur ceux d'origine artérielle (AMI). La conclusion importante de cette étude indique que le PDGF-BB inhibe plus fortement l'expression de p27^{Kip1} dans les

CMLV d'origine veineuse (VS) que dans celles dérivées d'AMI. Ce résultat suggère donc un rôle de p27^{Kip1} dans la réponse phénotypique de deux souches de CMLV et peut, en partie, expliquer le pourcentage élevé d'occlusion des transplantations d'origine veineuse versus artérielle observé *in vivo* (Yang et al., 1998). Nos résultats appuient également un tel modèle car dans les fibroblastes cardiaques où l'Ang II est un mitogène complet (voir introduction), l'expression de p27^{Kip1} est fortement diminuée par ce peptide vasoactif (Servant et Meloche, voir section résultats).

Ces études et nos résultats suggèrent fortement que le niveau d'expression de p27^{Kip1} est un déterminant majeur dans l'obtention d'un phénotype donné. Notre étude est cependant plus complète car elle propose un mécanisme moléculaire expliquant l'incapacité de l'Ang II à induire la division des CMLV. En effet, l'activation de Cdk2 est, comme nous l'avons vu dans l'introduction, dépendante de sa liaison avec la cycline E et de sa phosphorylation par CAK. Nos résultats démontrent ainsi que l'expression des cyclines de la phase G₁ (surtout les cyclines D) est augmentée par l'Ang II et le PDGF-BB. L'Ang II est cependant incapable d'induire la phosphorylation et l'activation de Cdk2. Cette incapacité n'est pas reliée au fait que l'Ang II ne puisse former des complexes entre les cyclines E et les Cdk2 (voir fig.4C dans l'article sur le cycle) mais serait plutôt reliée en partie à l'expression importante de p27^{Kip1} dans les CMLV stimulées par cet agent hypertrophique et la présence de cet inhibiteur dans les complexes Cdk2-cycline E (voir fig.5C dans l'article sur le cycle). Cette étude est aussi la première démontrant une régulation de l'ARN messager *Kip1* par un mitogène. Il a été mentionné dans l'introduction que la baisse d'expression de p27^{Kip1} résulte normalement de processus traductionnels (baisse de la traduction) et/ou post-traductionnels (phosphorylation de p27^{Kip1} et dégradation par la voie ubiquitine-protéasome). Notre modèle propose donc une élimination de p27^{Kip1} en deux étapes (voir figure 9, page 197). La première consiste en une baisse de transcription du gène *Kip1* (effet important du PDGF-BB comparativement à l'Ang II sur l'expression de l'ARNm, voir article). Cet effet sur la synthèse de novo de p27^{Kip1} baisse substantiellement le niveau d'expression de ce dernier. Cette baisse est, selon nous, assez importante pour libérer les complexes Cdk2-cycline E de la contrainte que leur imposait p27^{Kip1}. Ces complexes maintenant actifs phosphorylent cet inhibiteur et permettent ainsi sa dégradation. Cette élimination graduelle de p27^{Kip1} par des mitogènes (voir Fig. 9) permet de libérer de plus en plus de complexes Cdk2-cycline E qui phosphoryleront à leur tour cet inhibiteur. Une telle boucle de rétroaction positive sur l'élimination de p27^{Kip1} par phosphorylation a aussi été proposée par l'équipe de

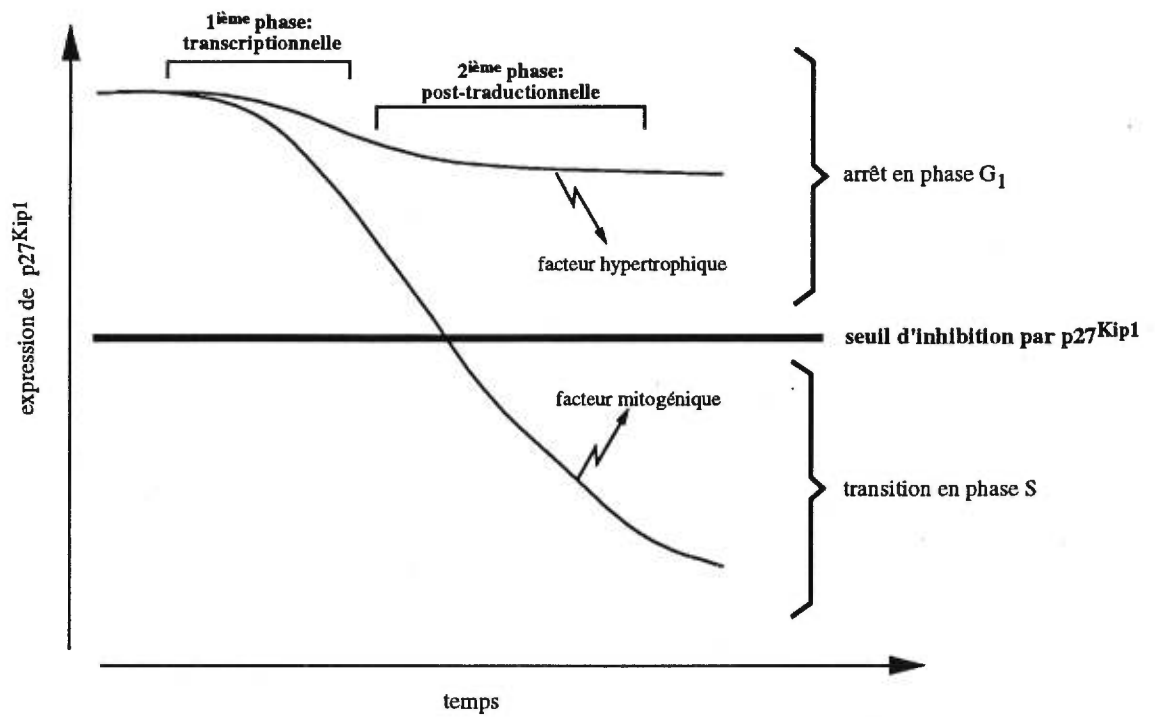


Figure 9: Schéma représentant les mécanismes moléculaires impliqués dans la baisse d'expression de p27^{Kip1} par un mitogène dans les CMLV.

Bruce Clurman (Sheaff et al., 1997). Une fois passé le seuil d'inhibition que p27^{Kip1} impose (par sa concentration) sur la totalité des complexes Cdk2-cycline E, ces derniers, maintenant hautement actifs, phosphorylent d'avantage ou "complètement" pRb (Lundberg et Weinberg, 1998) et permettent la transition au-delà du point "R" et ainsi le passage en phase S (voir Fig. 9).

Malgré la corrélation observée entre la teneur en p27^{Kip1} et "la décision" des CMLV de poursuivre vers la phase S, nos résultats ne font que suggérer fortement un rôle de p27^{Kip1} dans la réponse phénotypique des CMLV face aux facteurs de croissance. Une façon de vérifier directement le rôle de p27^{Kip1} serait de l'inactiver dans nos cellules. Pour ce faire, l'approche des oligonucléotides antisens est envisageable, mais en dernier recours seulement, vu leurs effets souvent non-spécifiques (voir plus haut). Nous nous proposons donc, grâce à l'utilisation d'alphavirus (qui permettent un bon niveau d'expression dans les CMLV), de l'inactiver en utilisant la séquence codante complète de p27^{Kip1} insérée en orientation antisens dans un vecteur d'expression, approche utilisée avec succès par l'équipe de Pouyssegur (Rivard et al., 1996). Une autre façon élégante serait d'utiliser des CMLV dérivées de souris transgéniques nulles pour le locus *Kip1*.

Comme mentionné dans l'introduction, les effets anti-prolifératifs du TGF- β sont reliés en partie à sa capacité d'inhiber la baisse d'expression de p27^{Kip1} par les mitogènes mais également d'augmenter l'expression de p21^{Cip1} et p15^{Ink4b} dans les cellules cibles. Il a été également démontré que l'Ang II peut induire l'expression et la production de TGF- β par les CMLV (Gibbons et al., 1992) et que le TGF- β est impliqué dans l'hypertrophie des CMLV (Owens et al., 1988). Ces résultats indiquent donc que le TGF- β pourrait, lorsque produit par des CMLV stimulées à l'Ang II, agir de façon autocrine et/ou paracrine sur ces dernières et ainsi participer aux processus moléculaires impliqués dans l'incapacité de l'Ang II à réduire l'expression de p27^{Kip1}. Ces conditions pourraient également permettre à l'Ang II d'induire une expression importante de p21^{Cip1} et/ou p15^{Ink4b} dans les CMLV. Cependant, l'expression de p15^{Ink4b} n'est sûrement pas augmentée par l'Ang II puisque que ce dernier induit une activation de Cdk4. D'autre part, des analyses Western indiquent également que l'Ang II n'induit aucune expression de p21^{Cip1} (résultats non-présentés) dans les CMLV. L'utilisation d'une lignée cellulaire très sensible aux effets anti-prolifératif du TGF- β , les Mv1Lu et d'un anticorps neutralisant dirigé contre la forme humaine du TGF- β a permis de conclure cependant que: 1) il n'y a aucune production de TGF- β détectable

dans le surnageant de CMLV stimulées par l'Ang II, 2) que même si des traces de TGF- β , non-déTECTABLES par notre approche, étaient produites par des CMLV stimulées par l'Ang II, l'utilisation de l'anticorp neutralisant n'a pas permis à l'Ang II d'induire ni une baisse d'expression de p27^{Kip1} ni une augmentation de la synthèse d'ADN (résultat non-présenté et voir article). Ces résultats indiquent clairement que l'incapacité de l'Ang II à induire la synthèse d'ADN dans les CMLV n'implique pas une participation du TGF- β .

Pour en revenir aux effets du PDGF-BB sur l'expression de l'ARNm codant pour p27^{Kip1} (analyse Northern, voir article), nous proposons une régulation transcriptionnelle du gène puisque l'effet biphasique observé sur l'expression du messager se reflète parfaitement sur la synthèse de novo de p27^{Kip1} (marquage methionine, voir article). Des analyses "nuclear run-on" qui seront effectuées sous peu permettront néanmoins de vérifier si les effets du PDGF-BB sont essentiellement transcriptionnels ou si le PDGF agit également sur la stabilité de l'ARNm. Finalement, nous avons entrepris la caractérisation du promoteur de rat du gène *Kip1* dans le but d'étudier quelles sont les voies de signalisation que le PDGF-BB active et lesquelles sont impliquées dans la baisse d'activité transcriptionnelle du gène. Des résultats préliminaires intéressants démontrent, par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, que les voies dépendantes du Ca²⁺ et des PKCs sont recrutées par les dimères de récepteurs PDGF β et impliquées dans la baisse de transcription du gène (Servant et Meloche, résultats non-publiés). Ces études pharmacologiques seront combinées aux approches moléculaires (étude du promoteur avec des gènes rapporteur) afin de caractériser de façon précise les séquences impliquées dans la répression du gène par le PDGF-BB.

3.1 Applications cliniques

Les rôles de Cdk2, de son inhibiteur p27^{Kip1} et de son substrat pRb ont été évalués récemment dans la régulation de la croissance des CMLV *in vivo*. Des études ont ainsi démontré que les fonctions de Cdk2 sont essentielles à la formation de la néointima après angioplastie (Abe et al., 1994; Morishita et al., 1994). La surexpression de p27^{Kip1} dans les CMLV par des adénovirus diminue la resténose post-angioplastie chez le rat (Chen et al., 1997). De plus, chez le rat, l'expression de p27^{Kip1} est augmentée quelques semaines après angioplastie. Ce haut niveau d'expression est accompagnée d'une baisse importante de l'activité de Cdk2 (Chen et

al., 1997). Ce mécanisme impliquant l'induction de p27^{Kip1} expliquerait en partie pourquoi il y a un arrêt de croissance des CMLV deux semaines après angioplastie (Chen et al., 1997; Tanner et al., 1998). Dans un même ordre d'idées, la surexpression d'une forme non-phosphorylable de pRb bloque également la prolifération néointimale des CMLV après une angioplastie (Chang et al., 1995). Notre étude *in vitro*, et toutes ces données *in vivo*, suggèrent donc un rôle essentiel de p27^{Kip1} comme régulateur de la réponse phénotypique des CMLV.

4.0 Modèle Rat1-AT₁ humain

Malgré toutes les données existant sur la signalisation activée par le récepteur AT₁ de rat et impliquées dans les effets trophiques de l'hormone (voir introduction et résultats), très peu de données expérimentales existent à ce jour sur le récepteur AT₁ humain. Nous avons donc développé un modèle cellulaire exprimant de façon stable le récepteur AT₁ humain, modèle qui pourra être utilisé par la suite pour répondre à plusieurs autres questions concernant, en autres, la signalisation précoce impliquée dans les effets trophiques du peptide.

La création d'une lignée de fibroblastes de rat exprimant un nombre physiologique de récepteurs AT₁ humain (Rat1-AT₁) nous a permis de conclure que ce récepteur a la capacité de transmettre des signaux intracellulaires identiques à ceux retrouvés dans les CMLV de rat. En effet, ce récepteur est couplé à au moins deux voies de signalisation précoces: activation de la voie Gq, donc de la voie des phosphoinositides, et activation de la voie Gi induisant une diminution de l'activité basale ou stimulée de l'adénylyl cyclase. Ces événements précoces de signalisation sont ensuite impliqués dans la signalisation intermédiaire comprenant entre autres l'activation des ERKs et celle de la p70^{S6k}. Finalement, l'induction de l'expression des gènes précoces reflète l'activation des voies de signalisation tardive. De plus, l'activation du récepteur AT₁ humain induit la synthèse protéique sans avoir cependant d'effets sur la synthèse d'ADN, illustrant une fois de plus l'incapacité de ce peptide d'induire la division cellulaire. Dans notre lignée de fibroblastes de rat, l'activation de plusieurs voies de signalisation identiques à celles retrouvées dans un modèle physiologique comme les CMLV, démontre que l'augmentation de la synthèse protéique globale induite par l'Ang II est une propriété intrinsèque du récepteur AT₁.

4.1 Événements de signalisation précoce: perspectives d'études futures

L'établissement d'une telle lignée peut s'avérer également très utile pour les études de signalisation précoce. Effectivement, une façon d'étudier la signalisation précoce d'un récepteur couplé aux protéines G est de créer, par exemple, des mutants du récepteur AT₁ qui ont toujours les mêmes propriétés pharmacologiques de liaison mais qui ont perdu la capacité d'activer spécifiquement une voie de signalisation particulière. Une série de mutations (AT₁D74E, AT₁Y292F, AT₁Y302F et AT₁S115A) qui découplent le récepteur AT₁ de la stimulation de la PLC ont été décrites par différentes équipes (Bihoreau et al., 1993; Marie et al., 1994; Laporte et al., 1996; Monnot et al., 1996) (voir introduction, section sur les propriétés biochimiques des récepteurs de l'Ang II). Cependant, aucune de ces études n'a posé la question suivante: l'activation de la PLC, et ainsi la voie G_q, est-elle essentielle aux effets hypertrophiques de l'hormone ? La réponse à ces questions soulève plusieurs problèmes. En effet, les CMLV expriment déjà un nombre important de récepteurs AT₁ endogènes et de plus, ces cellules ne répondent que très mal aux méthodes de transfection classiques de matériel génétique (liposomes cationiques, phosphate de calcium, DAE Dextran, etc...). Ayant démontré que la lignée Rat1-AT₁ répondait de façon classique à l'Ang II, nous avons donc décidé d'exploiter ce modèle afin d'exprimer de façon stable les formes mutées du récepteur AT₁: Rat1-AT₁D74E, Rat1-AT₁Y292F et Rat1-AT₁Y302F. Toutes ces lignées expriment un nombre physiologique de récepteurs et nous disposons déjà de résultats très intéressants pour l'une d'entre elles, Rat1-AT₁D74E. Dans ces cellules, en réponse à l'Ang II, la production d'InsP₃ (donc la stimulation de la PLC), ainsi que l'augmentation de la synthèse protéique sont complètement abolies (voir figures 10 et 11, pages 202-203). Ces résultats indiquent que la stimulation de la voie G_q, donc de la PLC, et des événements biochimiques en aval sont impliqués dans l'augmentation de la vitesse de synthèse protéique induite par l'Ang II dans les cellules Rat1-AT₁.

En ce qui concerne la voie G_i, nos résultats démontrent que, en utilisant la toxine de *B. pertussis*, cette voie n'est pas utilisée par l'Ang II afin d'induire la synthèse protéique et cela, aussi bien dans les CMLV que dans les Rat1-AT₁. De plus, la toxine de *B. pertussis* n'interfère pas avec l'activation des ERKs et de la p70^{s6k} dans le modèle Rat1-AT₁. Ces résultats sont également reproductibles dans les CMLV (voir section résultats; et Okuda et al., 1996) et indiquent ainsi que les sous-unités βγ

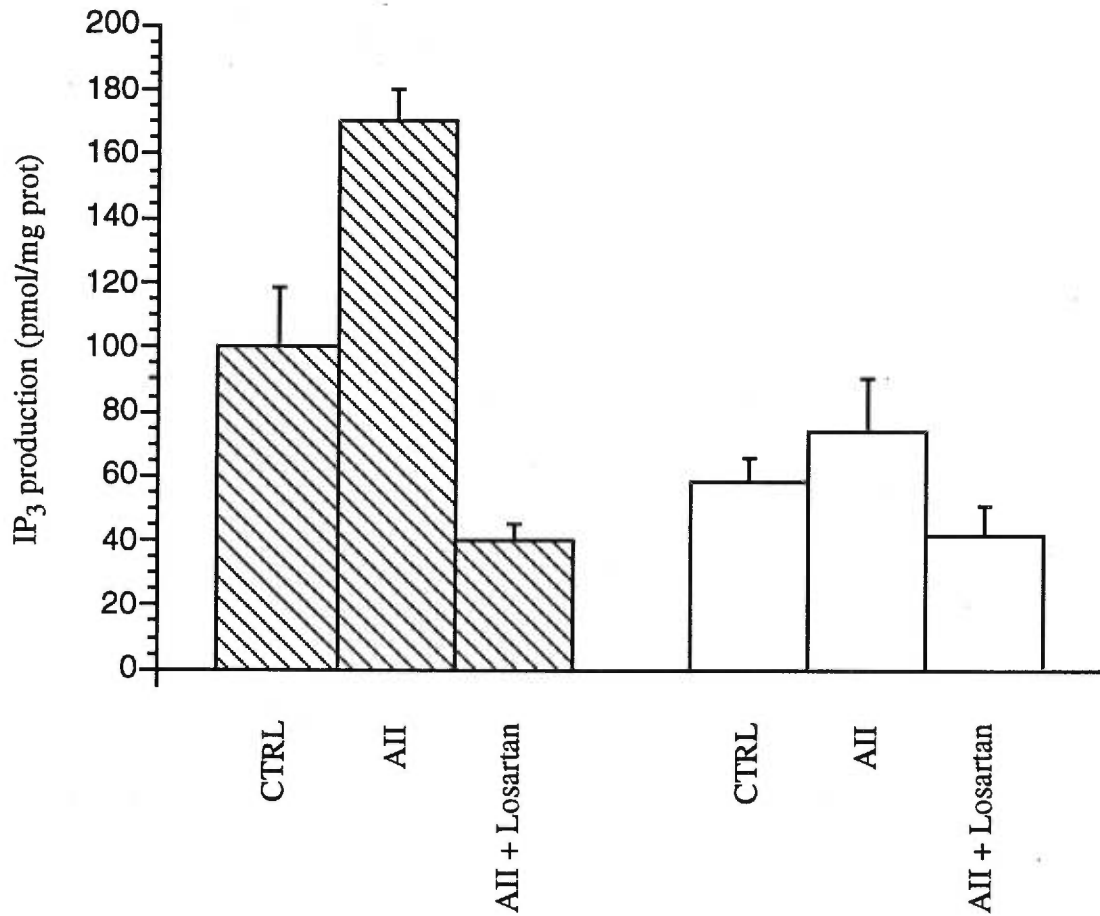


Figure 10: **La mutation du résidu acide aspartique 74 en acide glutamique dans le récepteur AT₁ humain (AT₁D74E) abolit le couplage fonctionnel entre le récepteur et la PLC.** Les Rat1-AT₁ exprimant le récepteur AT₁ humain sauvage (colonnes hachurées) ou muté D74E (colonnes vides) ont été incubées dans un milieu sans sérum pendant 24 heures. Ces cellules ont été ensuite stimulées avec 100 μ M d'Ang II pendant 15 sec. La production d'InsP₃ est mesurée par l'utilisation d'un "radiorecepteur essai".

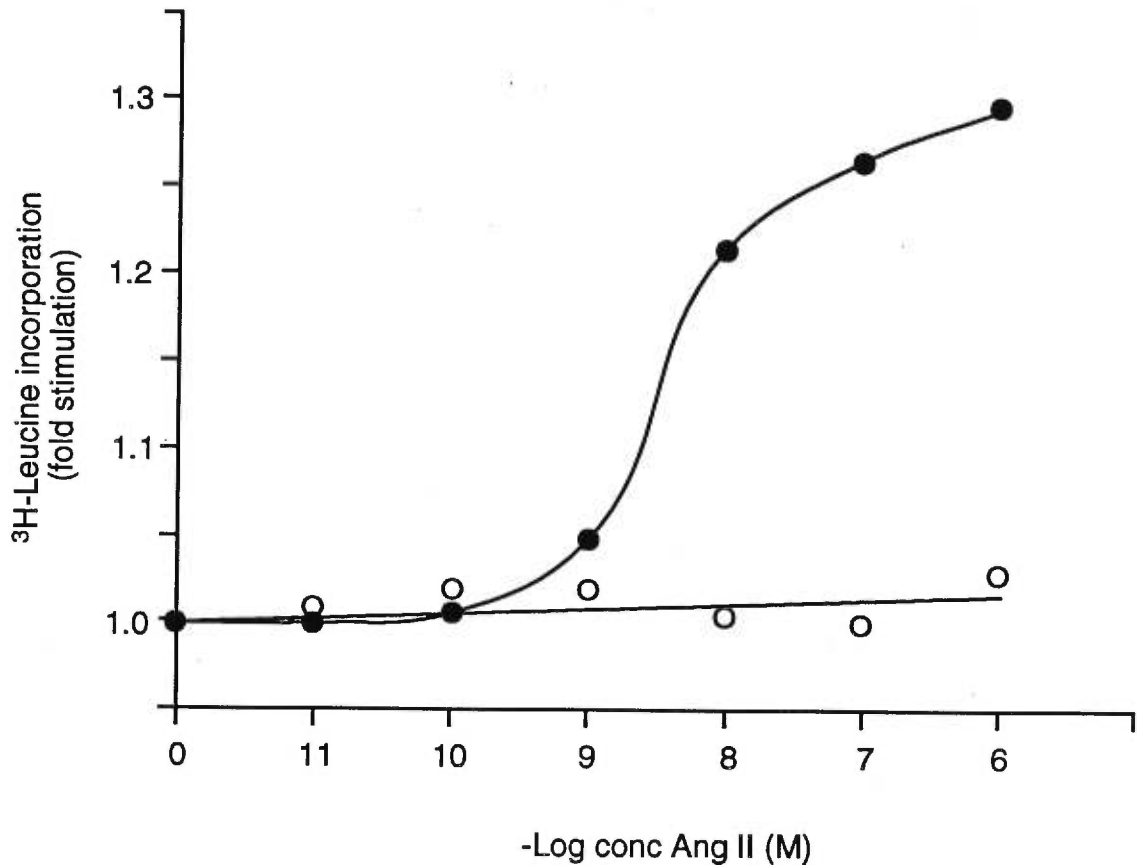


Figure 11: Le découplage fonctionnel du récepteur AT₁ de la PLC inhibe l'activation de la synthèse protéique par l'Ang II. Les Rat1-AT₁ exprimant le récepteur AT₁ humain sauvage (cercles pleins) ou muté D74E (cercles vides) ont été incubées dans un milieu sans sérum pendant 24 heures. Ces cellules ont été ensuite stimulées avec les concentrations indiquées d'Ang II pendant 24 heures. La synthèse protéique est mesurée par incorporation de [³H]leucine.

(voir introduction, section signalisation précoce) des protéines Gi ne font pas partie de l'arsenal de protéines que l'Ang II utilise afin d'induire l'hypertrophie des cellules cibles (du moins dans les modèles Rat1-AT₁ et CMLV). Par contre, les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines Gq sont toujours des candidats potentiels et les prochaines expériences tenteront de vérifier leur implication en exprimant dans les Rat1-AT₁ des plasmides antisens codant pour l'intégralité des sous-unités $\beta\gamma$ ou des plasmides encodant la phosphoducine ou le domaine PH de la β ARK.

5.0 Résumé

La figure 12 page 205 résume les différents résultats obtenus dans cette étude. Dans les CMLV, l'Ang II active les MEKs et les ERKs de la voie MAP kinase ERK. L'utilisation du PD98059 inhibe l'activation des ces kinases par l'Ang II de même que partiellement (70%) la synthèse protéique induite par ce peptide. L'utilisation de cet inhibiteur spécifique nous permet de conclure à un rôle essentiel de la voie MAP kinase ERK dans les effets hypertrophiques de l'Ang II dans les CMLV. Des études futures seront nécessaires afin de vérifier le ou les rôles de cette voie dans la régulation des machineries traductionnelle et transcriptionnelle ou dans les processus d'inter-relation ou de "cross-talk" entre les différentes voies que l'Ang II active (la voie JAK/STAT par exemple). C'est en étudiant les effets d'une élévation de l'AMPc dans les CMLV, par l'utilisation de la forskoline et de l'IBMX, que nous avons observé que ces composés antagonisent totalement les propriétés hypertrophiantes de l'Ang II. L'élévation de la teneur en AMPc n'inhibe cependant pas l'activation des MAP kinases ERK ainsi que de la p70^{s6k}, une autre voie impliquée dans les effets hypertrophiques de l'hormone (Giasson et Meloche, 1995). Une étude ultérieure de notre groupe a démontré que l'Ang II stimule également la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines adaptatrices et kinases et que l'utilisation de deux composés inhibant les tyrosine kinases, la génistéine et l'herbimycine A, antagonisent totalement les effets hypertrophiques de l'Ang II (Leduc et al., 1995a). En accord avec ces résultats, nous observons que les effets anti-hypertrophiant d'une élévation en AMPc se traduisent par une diminution de la phosphorylation sur résidu tyrosine de protéines spécifiques telles que la protéine adaptatrice paxilline et la tyrosine kinase TYK2 dans les CMLV. Ce schéma quoique complexe, démontre que des tyrosine kinases sensibles aux effets de l'herbimycine A, de la génistéine, de la forskoline et de l'IBMX ne sont pas impliquées dans la transmission du signal entre les récepteurs AT₁ activés et les effecteurs ERKs et p70^{s6k} puisque l'activation de ces derniers n'est pas affectée par l'utilisation de ces

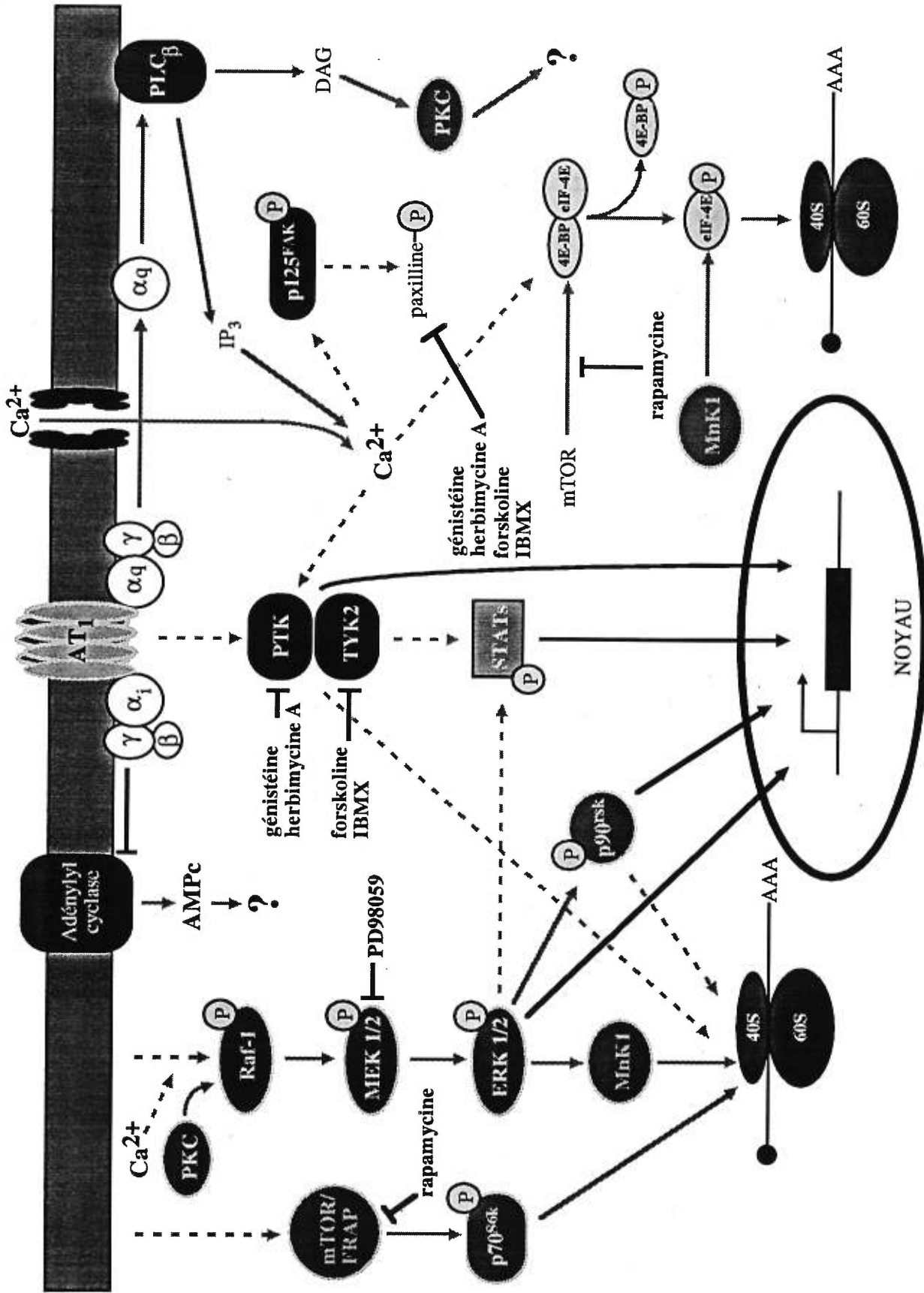


Figure 12. Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique par le récepteur AT1 (résumé de l'étude). Pour les abréviations, se référer à la liste en début de thèse.

composés. Cependant, comme mentionné dans les lignes précédentes, l'utilisation de l'herbimycine A, de la génistéine, de l'IBMX et de la forskoline inhibe totalement la synthèse protéique induite par l'Ang II. Ces résultats indiquent que fort probablement des processus de signalisation en aval des kinases ERKs et p70^{s6k} sont modulés également par des tyrosine kinases. Exemples: condensation et décondensation de la chromatine, facteurs de transcription, facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction, ou tout autres facteurs impliqués dans la régulation des machineries traductionnelle et transcriptionnelle. Ces affirmations restent cependant à être vérifiées. Finalement, l'utilisation de la toxine de *B. pertussis* qui découple le récepteur AT₁ de la protéine Gi n'a aucun effet sur la synthèse de protéine induit par l'Ang II dans les CMLV ou des fibroblastes de rat exprimant le récepteur AT₁ humain. Bien que la voie Gi ne semble pas utilisée par l'Ang II afin d'augmenter la synthèse protéique dans les cellules cibles, l'implication de la voie Gq et de ses effecteurs (Ca²⁺, PKC, ...) sera vérifiée sous peu par des approches moléculaires comme d'écrit dans la section précédente.

CONCLUSION

Les approches pharmacologiques utilisées par notre groupe démontrent que trois voies de signalisation sont impliquées de façon importante dans les effets trophiques de l'Ang II: les ERKs, la voie de la PI3-kinase et ses effecteurs (mTOR/RAFT1, p70^{s6k} et 4E-BPs) et les tyrosine kinases. Alors que le rôle de la voie PI3-kinase semble se concentrer au niveau de la régulation de la machinerie traductionnelle, le rôle des ERKs et des tyrosines kinases reste à préciser, tant au niveau traductionnel que transcriptionnel. Ainsi des approches moléculaires (sur-expression de kinases inactives ou actives, expression d'ADNc antisens, etc...) pourront permettre de déterminer de façon spécifique quelles sont les kinases recrutées par le récepteur AT₁ afin d'augmenter la vitesse de synthèse protéique dans les CMLV. Ces approches permettront également de vérifier si certaines kinases, insensibles aux concentrations des inhibiteurs pharmacologiques utilisés (comme probablement certaines tyrosine kinases), sont effectivement situées entre le récepteur AT₁ et des voies de signalisation en aval.

La compréhension des mécanismes moléculaires déterminant la réponse phénotypique des CMLV face aux facteurs de croissance est un sujet très important et intéressant, autant du point de vue fondamental que clinique. Nos résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le niveau d'expression de p27^{Kip1} doit être obligatoirement abaissé en dessous d'un seuil critique afin de permettre l'établissement d'une boucle de rétroaction positive qui augmentera la dégradation de cet inhibiteur. Ceci conduira alors à l'activation de Cdk2, et donc à la transition des cellules vers la phase de synthèse d'ADN. Des approches moléculaires comme l'étude du promoteur du gène codant pour p27^{Kip1} permettront de comprendre entre autres pourquoi un facteur hypertrophique comme l'Ang II ne diminue pas l'expression de l'ARNm de *Kip1* à des niveaux comparables à ceux observés lors de l'utilisation d'un facteur mitogénique comme le PDGF-BB.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les effets hypertrophiques de l'Ang II permettra tout d'abord d'approfondir nos connaissances sur la signalisation en aval d'un récepteur à sept passages transmembranaires. Elle nous permettra également de préciser quelles sont les voies essentielles aux effets trophiques du peptide. La caractérisation d'un modèle comme les CMLV et de l'un de ces principaux

effecteurs, l'Ang II, représente donc un lien important entre des études fondamentales portant sur croissance cellulaire et le traitement de pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque, deux maladies caractérisées par une croissance exagérée des CMLV.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, J., W. Zhou, J. Taguchi, N. Takuwa, K. Miki, H. Okasaki, K. Kurokawa, M. Kumada and Y. Takuwa**, *Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc2 and cdk2 oligonucleotides in rat carotid artery*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1994), **198**, 16-24.
- Abraham, S. T., H. Benschoter, C. M. Schworer and H. A. Singer**, *In situ Ca²⁺ dependence for activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 2506-13.
- Abraham, S. T., H. A. Benschoter, C. M. Schworer and H. A. Singer**, *A role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the mitogen-activated protein kinase signaling cascade of cultured rat aortic vascular smooth muscle cells*, *Circ. Res.*, (1997), **81**, 575-84.
- Agrawal, D., P. Hauser, F. McPherson, F. Dong, A. Garcis and W. J. Pledger**, *Repression of p27Kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells*, *Mol. Cell. Biol.*, (1996), **16**, 4327-4336.
- Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S.-i. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya and Y. Fukami**, *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*, *J. Biol. Chem.*, (1987), **262**, 5592-5595.
- Aktas, H., H. Cai and G. M. Cooper**, *Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1*, *Mol. Cell. Biol.*, (1997), **17**, 3850-7.
- Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley and A. R. Saltiel**, *PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 27489-94.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen**, *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*, *Curr. Biol.*, (1997), **7**, 261-269.
- Alexander, R. W., T. A. Brock, M. A. Gimbrone and S. L. Rittenhouse**, *Angiotensin II increases inositol triphosphate and calcium in vascular smooth muscle cells*, *Hypertension*, (1985), **7**, 447-451.
- Ali, M. S., P. P. Sayeski, L. B. Dirksen, D. J. Hayzer, M. B. Marrero and K. E. Bernstein**, *Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor*, *J. Biol. Chem.*, (1997b), **272**, 23382-8.

- Ali, M. S., B. Schieffer, P. Delafontaine, K. E. Bernstein, B. N. Ling and M. B. Marrero**, *Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1997a), **272**, 12373-9.
- Anderson, K. M., T. Murahashi, D. E. Dostal and M. J. Peach**, *Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells*, *Am. J. Physiol.*, (1992), **264**, C179-C188.
- Baker, K. M., M. I. Chernin, S. K. Wixson and J. F. Aceto**, *Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats*, *Am. J. Physiol.*, (1990), **259**, H324-H332.
- Beretta, L., A. C. Gingras, Y. V. Svitkin, M. N. Hall and N. Sonenberg**, *Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation*, *EMBO J.*, (1996), **15**, 658-64.
- Berk, B. C., M. S. Aronow, T. A. Brock, E. J. Cragoe, M. A. J. Gimbrone and R. W. Alexander**, *Angiotensin II-stimulated Na^+/H^+ exchange in cultured vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1987), **262**, 5057-5064.
- Berk, B. C., V. Vekshtein, H. M. Gordon and T. Tsuda**, *Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells*, *Hypertension*, (1989), **13**, 305-314.
- Bernstein, K. E. and B. C. Berk**, *The biology of angiotensin II receptors*, *Am. J. Kidney Dis.*, (1993), **22**, 745-54.
- Bhat, G. J., T. J. Thekkumkara, W. G. Thomas, K. M. Conrad and K. M. Baker**, *Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 31443-9.
- Bihoreau, C., C. Monnot, E. Davies, B. Teutsch, K. E. Bernstein, P. Corvol and E. Clauser**, *Mutation of Asp74 of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1993), **90**, 5133-5137.
- Bishopric, N. H., V. V. Jayasena and K. A. Webster**, *Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by Fos and Jun in cardiac myocytes*, *J. Biol. Chem.*, (1992), **267**, 25535-25540.

- Blain, S. W., E. Montalvo and J. Massagué, *Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4*, J. Biol. Chem., (1997), **272**, 25863-25872.
- Bochaton-Paillat, M.-L., P. Ropraz, F. Gabbiani and G. Gabbiani, *Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implication for the development of experimental intimal thickening*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., (1996), **16**, 815-820.
- Boguski, M. S. and F. McCormick, *Proteins regulating ras and its relatives*, Nature, (1993), **366**, 643-654.
- Böhm, S. K., E. F. Grady and N. W. Brunnett, *Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-coupled receptors*, Biochem. J., (1997), **322**, 1-18.
- Bottari, S. P., V. Taylor, I. N. King, Y. Bogdal, S. Whitebread and M. de Gasparo, *Angiotensin II AT2 receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins*, Eur. J. Pharmacol., (1991), **207**, 157-163.
- Boulanger, C. M., L. Caputo and B. I. Levy, *Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery*, Hypertension, (1995), **26**, 752-757.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick, *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*, Nature, (1991), **349**, 117-127.
- Braun-Menendez, E., J. C. Fasciolo, L. F. Leloire and J. N. Munoz, *The substance causing renal hypertension*, J. Physiol., (1940), **98**, 283-298.
- Brinson, A. E., T. Harding, P. A. Diliberto, Y. He, X. Li, D. Hunter, B. Herman, S. Earp and L. M. Graves, *Regulation of a calcium-dependent tyrosine kinase in vascular smooth muscle cells by angiotensin II and platelet-derived growth factor*, J. Biol. Chem., (1998), **273**, 1711-1718.
- Brock, T. A., R. W. Alexander, L. S. Ekstein, W. J. Atkinson and M. A. J. Gimbrone, *Angiotensin increase cytosolic free calcium in cultured vascular smooth muscle cells*, Hypertension, (1985), **7**(suppl I), I-105-I-109.
- Brondello, J. M., F. R. McKenzie, H. Sun, N. K. Tonks and J. Pouyssegur, *Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts*, Oncogene, (1995), **10**, 1895-904.

- Brooks, D. P. and R. R. J. Ruffolo**, *Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors*. Angiotensin II Receptors Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Perspectives. (R. R. Ruffolo, Jr.). CRC Press, Inc., Boca Raton, (1994), 71-102.
- Brunet, A., G. Pagès and J. Pouysségur**, *Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts*, *Oncogene*, (1994), **9**, 3379-3387.
- Burnett, P. E., R. K. Barrow, N. A. Cohen, S. H. Snyder and D. M. Sabatini**, *RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70s6 kinase and 4E-BP1*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1998), **95**, 1432-1437.
- Burns, K. D., T. Inagami and R. C. Harris**, *Cloning of a rabbit kidney cortex AT(1) angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium*, *Am. J. Physiol.*, (1993), **264**, F645-F654.
- Burns, L., K. L. Clark, J. Bradley, M. J. Robertson and A. J. L. Clarck**, *Molecular cloning of the canine angiotensin II receptor: an AT1-like receptor with reduced affinity for DUP753*, *FEBS Lett.*, (1994), **343**, 146-150.
- Calalb, M. B., T. R. Polte and S. K. Hanks**, *Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases*, *Mol. Cell. Biol.*, (1995), **15**, 954-63.
- Catt, K. J., K. Sandberg and T. Balla**, *Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms*. Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. (M. K. Raizada, M. I. Phillips and C. Sumners). CRC Press, Inc., Boca Raton, (1993), 307-356.
- Chan, F. K., J. Zhang, L. Cheng, D. N. Shapiro and A. Winoto**, *Identification of human and mouse p19, a novel Cdk4 and Cdk6 inhibitor with homology to p16ink4*, *Mol. Cell. Biol.*, (1995), **15**, 2682-2688.
- Chang, M. W., E. Barr, J. Seltzer, Y.-Q. Jiang, G. J. Nabel, E. G. Nabel, M. S. Parmacek and J. Leiden**, *Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product*, *Science*, (1995), **267**, 518-522.
- Chassagne, C., B. G. Beatty and S. Meloche**, *Assignment of the Human Angiotensin-II Type 2 Receptor Gene (AGTR2) to Chromosome Xq22-q23 by Fluorescence in Situ Hybridization*, *Genomics*, (1995), **25**, 601-603.

- Chen, D., K. Krasinski, D. Chen, A. Sylvester, J. Chen, P. D. Nisen and V. Andrés**, *Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity in vascular smooth muscle cells by p27^{Kip1}, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery*, *J. Clin. Invest.*, (1997), **99**, 2234-2341.
- Cheng, M., V. Sexl, C. Sheer and M. F. Roussel**, *Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27^{Kip1} regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1)*, *P.N.A.S.*, (1998), **95**, 1091-1096.
- Claesson-Welsh, L.**, *Platelet-derived growth factor receptor signals*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 32023-32026.
- Clapham, D. E.**, *Calcium signaling*, *Cell*, (1995), **80**, 259-268.
- Clapham, D. E. and E. J. Neer**, *New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling*, *Nature*, (1993), **365**, 403-406.
- Clurman, B. E., R. J. Sheaff, K. Thress, M. Groudine and J. M. Roberts**, *Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation*, *Genes Dev.*, (1996), **10**, 1979-1990.
- Clynes, C. D., M. R. Nicol, S. MacDonald, B. C. Williams and S. W. Walker**, *Angiotensin II stimulates growth and steroidogenesis in zona fasciculata/reticularis cells from bovine adrenal cortex via the AT1 receptor subtype*, *Endocrinology*, (1993), **132**, 2206-2212.
- Coats, S., W. M. Flanagan, J. Nourse and J. M. Roberts**, *Requirement of p27^{Kip1} for restriction point control of the fibroblasts cell cycle*, *Science*, (1996), **272**, 877-880.
- Conchon, S., M.-B. Barrault, S. Miserey, P. Corvol and E. Clauser**, *The C-terminal third intracellular loop of the AT1A receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 25566-25572.
- Connell-Crowley, L., S. J. Elledge and W. J. Harper**, *G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts*, *Curr. Biol.*, (1998), **8**, 65-68.
- Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp and C. J. Marshall**, *Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells*, *Cell*, (1994), **77**, 841-52.
- Crespo, P., N. Z. Xu, W. F. Simonds and J. S. Gutkind**, *Ras-Dependent Activation Of Map Kinase Pathway Mediated By G-Protein Beta-Gamma Subunits*, *Nature*, (1994), **369**, 418-420.

- Curnow, K. M., L. Pascoe and P. C. White, *Genetic analysis of the human Type-1 angiotensin II receptor*, *Mol. Endocrinol.*, (1992), **6**, 1113-1118.
- Dahia, P. L. M., R. C. T. Aguiar, J. Honegger, R. Fahlbush, S. Jordan, D. G. Lowe, X. Lu, R. N. Clayton, G. M. Besser and A. B. Grossman, *Mutation and expression analysis of the p27/kip1 gene in corticotrophin-secreting tumors*, *Oncogene*, (1998), **12**, 69-76.
- Darnell, J. E. J., I. M. Kerr and G. R. Stark, *Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins*, *Science*, (1994), **264**, 1415-1421.
- Dash, P. K., K. A. Karl, M. A. Colicos, R. Prywes and E. R. Kandel, *cAMP response element-binding protein is activated by Ca^{2+} /calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1991), **88**, 5061-5065.
- Datto, M. B., Y. Li, J. F. Panus, D. J. Howe, Y. Xiong and X. F. Wang, *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995), **92**, 5545-5549.
- Daub, H., F. U. Weiss, C. Wallasch and A. Ullrich, *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*, *Nature*, (1996), **379**, 557-60.
- de Gasparo, M., N. R. Levens, B. Kamber, P. Furet, S. Whitebread, V. Brechler and S. P. Bottari, *The Angiotensin II AT₂ Receptor Subtype*. *Angiotensin Receptors*. (J. M. Saavedra and P. B. M. W. M. Timmermans). Plenum Press, New York, (1994), 95-117.
- de Groot, R. P., L. M. Ballou and P. Sassone-Corsi, *Positive Regulation of the cAMP-Responsive Activator CREM by the p70 S6 Kinase: An Alternative Route to Mitogen-Induced Gene Expression*, *Cell*, (1994), **79**, 81-91.
- de Groot, R. P., J. den Hertog, J. R. Vandenheede, J. Goris and P. Sassone-Corsi, *Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function*, *EMBO J.*, (1993), **12**, 3903-3911.
- De Léan, A., J. M. Stadel and R. J. Lefkowitz, *A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor*, *J. Biol. Chem.*, (1980), **255**, 7108-7117.
- Dekker, L. V. and P. J. Parker, *Protein kinase C-a question of specificity*, *Trends Biochem. Sci.*, (1994), **19**, 73-77.

- Deng, C., P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge and P. Leder,** *Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control*, *Cell*, (1995), **82**, 675-84.
- 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**, 729-47.
- Dennis, P. B., N. Pullen, S. C. Kozma and G. Thomas,** *The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases*, *Mol. Cell. Biol.*, (1996), **16**, 6242-6251.
- Desarnaud, F., J. Marie, C. Lombard, R. Larguier, R. Seyer, T. Lorca, S. Jard and J. C. Bonnafous,** *Deglycosylation and fragmentation of purified rat liver angiotensin II receptor: Application to the mapping of hormone-binding domains*, *Biochem. J.*, (1993), **289**, 289-297.
- Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge and J. Schlessinger,** *A role for Pyk2 and src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation*, *Nature*, (1996), **383**, 547-550.
- Dixon, B. S., R. V. Sharma, T. Dickerson and J. Fortune,** *Bradykinin and angiotensin II: activation of protein kinase C in arterial smooth muscle*, *Am. J. Physiol.*, (1994), **266**, C1406-C1420.
- Dudley, D. T., S. E. Hubbel and R. M. Summerfelt,** *Characterization of angiotensin II (AT₂) binding sites in R3T3 cells*, *Mol. Pharmacol.*, (1991), **40**, 360-367.
- Dudley, D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges and A. R. Saltiel,** *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995), **92**, 7686-7689.
- Duff, J. L., B. C. Berk and M. A. Corson,** *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.
- Duff, J. L., M. B. Marrero, W. G. Paxton, C. H. Charles, L. F. Lau, K. E. Bernstein and B. C. Berk,** *Angiotensin II induces 3CH134, a protein-tyrosine phosphatase, in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 26037-40.

- Durstin, M., S. Durstin, T. F. P. Molski, E. L. Becker and R. Sha'afi**, *Cytoplasmic phospholipase A₂ translocate to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated kinase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994), **91**, 3142-3146.
- Dzau, V. J.**, *Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure*, Archive in Internal Medicine, (1993), **153**, 937-942.
- Dzau, V. J. and R. E. Pratt**, *Local cardiac, vascular, and renal renin-angiotensin system in physiology and diseases*. The renin-angiotensin system. (J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls). Raven Press, New York, (1993), 42.1-42.11.
- Edwards, D. R.**, *Cell signalling and the control of gene transcription*, Trends Pharmacol. Sci., (1994), **15**, 239-244.
- Eguchi, S., T. Matsumoto, E. D. Motley, H. Utsunomiya and T. Inagami**, *Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase*, J. Biol. Chem., (1996), **271**, 14169-75.
- El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein**, *WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression*, Cell, (1993), **75**, 817-825.
- Epstein, S. E., E. Speir and T. Finkel**, *Do antisense approaches to the problem of restenosis make sense?*, Circulation, (1993), **88**, 1351-1353.
- Erpel, T. and S. A. Courtneidge**, *Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways*, Curr. Opin. Cell Biol., (1995), **7**, 176-82.
- Espinosa, E. A. and M. G. Nicholls**, *Renin and the control of aldosterone*. The renin-angiotensin system. (J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls). Raven Press, New York, (1993), 33.1-33.24.
- Ewen, M. E., H. K. Sluss, L. L. Whitehouse and D. M. Livingston**, *TGF- β inhibition of CDK4 synthesis is linked to cell cycle arrest*, Cell, (1993), **74**, 1009-1020.
- Feramisco, J. R., M. Gross, T. Kamata, M. Rosenberg and R. W. Sweet**, *Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells*, Cell, (1984), **38**, 109-117.

- Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L.-H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky and J. M. Roberts, *A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice*, *Cell*, (1996), **85**, 733-744.
- Fleurent, M., A. C. Gingras, N. Sonenberg and S. Meloche, *Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 4006-12.
- Florenes, V. A., N. Bhattacharya, M. R. Bani, Y. Ben-David, R. S. Kerbel and J. M. Slingerland, *TGF-beta mediated G1 arrest in a human melanoma cell line lacking p15^{INK4B}: evidence for cooperation between p21^{Cip1}/WAF1 and p27^{Kip1}*, *Oncogene*, (1996), **13**, 2447-57.
- Force, T., J. M. Kyriakis, J. Avruch and V. Bonventre, *Endothelin, vasopressin, and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and -independent pathways in glomerular mesangial cells*, *J. Biol. Chem.*, (1991), **266**, 6650-6656.
- Freeman, B. A. and J. D. Crapo, *Biology of disease: free radicals and tissue injury*, *Laboratory Investigations*, (1982), **47**, 412-425.
- Fujii, N., M. Tanaka, J. Ohnishi, K. Yukawa, E. Takimoto, S. Shimada, M. Naruse, F. Sugiyama, K. Yagami, K. Marakami and H. Miyazaki, *Alteration of angiotensin II receptor contents in hypertrophied hearts*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1995), **212**, 326-333.
- Fukunaga, R. and T. Hunter, *MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates*, *EMBO J.*, (1997), **16**, 1921-33.
- Furata, H., D. F. Guo and T. Inagami, *Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type I receptor*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **183**, 8-13.
- Geisterfer, A. A. T., M. J. Peach and G. K. Owens, *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells*, *Circ. Res.*, (1988), **62**, 749-756.
- Giasson, E. and S. Meloche, *Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 5225-31.

- Gibbons, G. H., R. E. Pratt and V. J. Dzau**, *Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia*, J. Clin. Invest., (1992), **90**, 456-461.
- Gingras, A.-C. and O. Donzé**, *Régulation par l'insuline de l'initiation de la synthèse protéique*, Médecine/Sciences, (1995), **11**, 866-872.
- Glennon, P. E., S. Kaddoura, E. M. Sale, G. J. Sale, S. J. Fuller and P. H. Sugden**, *Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes*, Circ. Res., (1996), **78**, 954-61.
- Graves, L. M., K. E. Bornfeldt, G. M. Argast, E. G. Krebs, X. Kong, T. A. Lin and J. C. Lawrence, Jr.**, *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. USA, (1995), **92**, 7222-6.
- Griendling, K. K. and R. W. Alexander**, *The angiotensin (AT1) receptor*, Semin. Nephrol., (1993), **13**, 558-66.
- Griendling, K. K., P. Delafontaine, S. E. Rittenhouse, M. A. Gimbrone and R. W. Alexander**, *Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells*, J. Biol. Chem., (1987), **262**, 14555-14562.
- Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw and R. W. Alexander**, *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*, Circ. Res., (1994), **74**, 1141-8.
- Griendling, K. K., S. E. Rittenhouse, T. A. Brock, L. S. Ekstein, M. A. J. Gimbrone and R. W. Alexander**, *Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells*, J. Biol. Chem., (1986), **261**, 5901-5906.
- Griendling, K. K., M. Ushio-Fukai, B. Lassegue and R. W. Alexander**, *Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts*, Hypertension, (1997), **29**, 366-73.
- Griffin, S. A., W. C. B. Brown, F. MacPherson, J. C. McGrath, V. G. Wilson, N. Korsgaard, M. J. Mulvany and A. F. Lever**, *Angiotensin II Causes Vascular Hypertrophy in Part by a Non-pressor Mechanism*, Hypertension, (1991), **17**, 626-635.

- Groblewski, T., B. Maigret, R. Larguier, C. Lombard, J.-C. Bonnafeous and J. Marie, *Mutation of Asn¹¹¹ in the third transmembrane domain of the AT_{1A} angiotensin II receptor induces its constitutive activation*, J. Biol. Chem., (1997), **272**, 1822-1826.
- Gu, Y., J. Rosenblatt and D. O. Morgan, *Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15*, EMBO J., (1992), **11**, 3995-4005.
- Gu, Y., C. W. Turck and D. O. Morgan, *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit*, Nature, (1993), **366**, 707-710.
- Guan, K. L., C. W. Jenkins, Y. Li, M. A. Nichols, X. Wu, C. L. O'keefe, A. G. Matera and Y. Xiong, *Growth suppression by p18, a p16 ink4/MTS1- and p14 ink4B/MTS2-related Cdk6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function*, Genes Dev., (1994), **8**, 2939-2952.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov and R. Brent, *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associate with Cdk2*, Cell, (1993), **75**, 791-803.
- Hahn, A. W. A., T. J. Resink, J. Bernhardt, F. Ferracin and F. R. Bühler, *Stimulation of autocrine platelet-derived growth factor AA-homodimer and transforming growth factor β in vascular smooth muscle cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1991), **178**, 1451-1458.
- Hannon, G. J. and D. Beach, *p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest*, Nature, (1994b), **371**, 257-261.
- Hannon, G. J., D. Casso and D. Beach, *KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994a), **91**, 1731-5.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge, *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*, Cell, (1993), **75**, 805-816.
- Harper, J. W., S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley and E. Swindell, *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*, Mol. Cell. Biol., (1995), **6**, 387-400.
- Hatori, N., B. P. Fine, A. Nakamura, E. J. Cragoe and A. Aviv, *Angiotensin II effect on cytosolic pH in cultured rat vascular smooth muscle cells*, J. Biol. Chem., (1987), **262**, 5073-5078.

- Hautmann, M. B., M. M. Thompson, E. A. Swartz, E. N. Olson and G. K. Owens, *Angiotensin II-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin expression by serum response factor and the homeodomain transcription factor MBox*, *Circ. Res.*, (1997), **81**, 600-10.
- Haystead, T. A. J., C. M. M. Haystead, C. Hu, T. A. Lin and J. C. J. Lawrence, *Phosphorylation of PHAS-I by mitogen-activated protein (MAP) kinase*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 23185-23191.
- Heasley, L. E. and G. L. Johnson, *The beta-PDGF receptor induces neuronal differentiation of PC12 cells*, *Mol. Biol. Cell*, (1992), **3**, 545-53.
- Hein, L., G. S. Barsh, R. E. Pratt, V. J. Dzau and B. K. Kobilka, *Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice*, *Nature*, (1995), **377**, 744-747.
- Hein, L., L. Meinel, R. E. Pratt, V. J. Dzau and B. K. Kobilka, *Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand*, *Mol. Endocrinol.*, (1997b), **11**, 1266-77.
- Hein, L., M. E. Stevens, G. S. Barsh, R. E. Pratt, B. K. Kobilka and V. J. Dzau, *Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997a), **94**, 6391-6.
- Hengst, L. and S. I. Reed, *Translational control of p27kip1 accumulation during the cell cycle*, *Science*, (1996), **271**, 1861-1864.
- Hershey, J. C., M. Hautmann, M. M. Thompson, L. I. Rothblum, T. A. Haystead and G. K. Owens, *Angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle is associated with increased 18 S rRNA synthesis and phosphorylation of the rRNA transcription factor, upstream binding factor*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 25096-101.
- Herzig, T. C., S. M. Jobe, H. Aoki, J. D. Molkenin, A. W. Cowley, Jr., S. Izumo and B. E. Markham, *Angiotensin II type1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997), **94**, 7543-8.

- Hirai, A., S. Nakamura, Y. Noguchi, T. Yasuda, M. Kitagawa, I. Tatsuno, T. Oeda, K. Tahara, T. Terano, S. Narumiya, L. D. Kohn and Y. Saito, *Geranylgeranylated Rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 13-16.
- Hirai, H., M. F. Roussel, J.-Y. Kato, R. A. Ashmun and C. J. Sherr, *Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclinD-dependent kinases CDK4 and CDK6*, *Mol. Cell. Biol.*, (1995), **15**, 2672-2681.
- Hodgson, E. K. and I. Fridovich, *The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme*, *Biochemistry*, (1975), **14**, 5294-5295.
- Homma, Y., H. Sakamoto, M. Tsunoda, M. Aoki, T. Takenawa and T. Ooyama, *Evidence for involvement of phospholipase C-gamma 2 in signal transduction of platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells*, *Biochem. J.*, (1993), **290**, 649-53.
- Hordijk, P. L., I. Verlaan, E. J. van Corven and W. H. Moolenaar, *Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in rat-1 fibroblasts*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 645-651.
- Hug, H. and T. F. Sarra, *Protein kinase C isoenzymes-divergence in signal transduction*, *Biochem. J.*, (1993), **291**, 329-343.
- Hunyady, L., A. J. Baukal, T. Balla and K. J. Catt, *Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction*, *J. Biol. Chem.*, (1994a), **269**, 24798-804.
- Hunyady, L., M. Bor, T. Balla and K. J. Catt, *Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor*, *J. Biol. Chem.*, (1994b), **269**, 31378-82.
- Ichiki, T., P. A. Labosky, C. Shiota, S. Okuyama, Y. Imagawa, A. Fogo, F. Niimura, I. Ichikawa, B. L. M. Hogan and T. Inagami, *Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor*, *Nature*, (1995), **377**, 748-750.
- Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, W. E. Thierfelder, B. Kreider and O. Silvennoinen, *Signalling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs*, *Trends Biochem. Sci.*, (1994), **19**, 222-227.

- Indolfi, C., E. V. Avvedimento, E. Di Lorenzo, G. Esposito, A. Rapacciolo, P. Giuliano, D. Grieco, L. Cavuto, A. M. Stingone, I. Ciullo, G. Condorelli and M. Chiariello, *Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury*, Nat. Med., (1997), 3, 775-779.**
- Indolfi, C., E. V. R. Avvedimento, A., E. Di Lorenzo, G. Esposito, E. Stabile, A. Feliciello, E. Mele, P. Giuliano, G. Condorelli and M. Chiariello, *Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo*, Nat. Med., (1995), 1, 541-545.**
- Ishida, M., T. Ishida, S. M. Thomas and B. C. Berk, *Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells*, Circ. Res., (1998), 82, 7-12.**
- Ishida, M., M. B. Marrero, B. Schieffer, T. Ishida, K. E. Bernstein and B. C. Berk, *Angiotensin II activates pp60^{c-src} in vascular smooth muscle cells*, Circ. Res., (1995), 77, 1053-1059.**
- Ishida, Y., Y. Kawahara, T. Tsuda and M. Yokoyama, *Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells*, FEBS Lett., (1992), 310, 41-45.**
- Ishizaka, N., R. W. Alexander, J. B. Laursen, H. Kai, T. Fukui, M. Oppermann, R. J. Lefkowitz, P. R. Lyons and K. K. Griendling, *G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation By angiotensin ii and hypertension [In Process Citation]*, J. Biol. Chem., (1997), 272, 32482-8.**
- Ishizaka, N., K. K. Griendling, T. Fukui, M. Oppermann, R. J. Lefkowitz and R. W. Alexander, FASEB J., (1996), 10, A1134 (abstract).**
- Itazaki, K., Y. Shigeri and M. Fijimoto, *Molecular cloning and characterization of the angiotensin receptor subtype 1 in porcine aortic smooth muscle*, Eur. J. Pharmacol., (1993), 254, 147-256.**
- Itoh, H., M. Mukoyama, R. E. Pratt, G. H. Gibbons and V. J. Dzau, *Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II*, J. Clin. Invest., (1993), 91, 2268-2274.**
- Iwai, N. and T. Inagami, *Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor*, FEBS Lett., (1992), 298, 257-260.**

- Iwaki, K., V. P. Sukhatme, H. E. Shubeita and K. R. Chien, *α - and β -adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells*, *J. Biol. Chem.*, (1990), **265**, 13809-13817.
- Jiang, H., H. Chou and L. Zhu, *Requirement of cyclin E-Cdk2 inhibition in p16Ink4a-mediated growth suppression*, *Mol. Cell. Biol.*, (1998), **18**, 5284-5290.
- Kahan, C., K. Seuwen, S. Meloche and J. Pouyssegur, *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**, 13369-75.
- Kai, H., T. Fukui, B. Lassegue, A. Shah, C. A. Minieri and K. K. Griending, *Prolonged exposure to agonist results in a reduction in the levels of the Gq/G11 alpha subunits in cultured vascular smooth muscle cells*, *Mol. Pharmacol.*, (1996), **49**, 96-104.
- Kakar, S. S., K. K. Riel and J. D. Neill, *Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992b), **185**, 688-692.
- Kakar, S. S., J. C. Sellers, D. C. Devor, L. C. Musgrove and J. D. Neil, *Angiotensin II Type-1 receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992a), **183**, 1090-1096.
- Kambayashi, Y., S. Bardhan, K. Takahashi, S. Tsuzuki, H. Inui, T. Hamakubo and T. Inagami, *Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 24543-24546.
- Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 16483-16486.
- Kato, J.-Y., M. Matsuoka, D. K. Strom and C. J. Sherr, *Regulation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase*, *Mol. Cell. Biol.*, (1994a), **14**, 2713-2721.
- Kato, J. Y., M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massagué and C. J. Sherr, *Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation*, *Cell*, (1994b), **79**, 487-496.

- Kawada, M., S. Yamagoe, Y. Murakami, K. Suzuki, S. Mizuno and Y. Uehara**, *Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by RAs through the MAP kinase signaling pathway*, *Oncogene*, (1997), **15**, 629-637.
- Kawahara, Y., M. Sunako, T. Tsuda, H. Fukuzaki, Y. Fukumoto and Y. Takai**, *Angiotensin II induces expression of the c-fos gene through protein kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1988), **150**, 52-59.
- Keyse, S. M.**, *An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases*, *Biochim. Biophys. Acta*, (1995), **1265**, 152-160.
- Keyse, S. M. and E. A. Emslie**, *Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase*, *Nature*, (1992), **359**, 644-647.
- Kim, H. S., J. H. Krege, K. D. Kluckman, J. R. Hagaman, J. B. Hodgins, C. F. Best, J. C. Jennette, T. M. Coffman, N. Maeda and O. Smithies**, *Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995a), **92**, 2735-2739.
- Kim, S., P. Angel, K. Lafyatis, K. Hattori, K. Y. Kim, M. B. Sporn, M. Karin and A. B. Roberts**, *Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex*, *Mol. Cell. Biol.*, (1990), **10**, 1492-1497.
- Kim, S. K., K. Ohta, A. Hamaguchi, T. Yukimura, K. Miura and H. Iwao**, *Angiotensin II Induces Cardiac Phenotypic Modulation and Remodeling In Vivo In Rats*, *Hypertension*, (1995b), **25**, 1252-1259.
- Kimball, S. R., T. C. Vary and L. S. Jefferson**, *Regulation of protein synthesis by insulin*, *Annu. Rev. Physiol.*, (1994), **56**, 321-348.
- Kitami, Y., T. Okura, K. Marumoto, R. Wakamiya and K. Hiwada**, *Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **188**, 446-452.
- Kiyokawa, H., R. D. Kineman, K. O. Manova-Todorova, V. C. Soares, E. S. Hoffman, M. Ono and D. Khanam**, *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}*, *Cell*, (1996), **85**, 721-732.

- Knoblich, J. A., K. Sauer, L. Jones, H. Richardson, R. Saint and C. F. Lehner**, *Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during Drosophila embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation*, *Cell*, (1994), **77**, 107-120.
- Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, R. Flanza and J. M. Roberts**, *Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G₁ phase of the human cell cycle*, *Science*, (1992), **257**, 1689-1693.
- Koibuchi, Y., W. S. Lee, G. H. Gibbons and R. E. Pratt**, *Role of transforming growth factor-beta 1 in the cellular growth response to angiotensin II*, *Hypertension*, (1993), **21**, 1046-50.
- Kolch, W., G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marme and U. R. Rapp**, *Protein kinase Ca activates Raf-1 by direct phosphorylation*, *Nature*, (1993), **364**, 249-252.
- Kolch, W., G. Heidecker, P. Lloyd and U. R. Rapp**, *Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells*, *Nature*, (1991), **12**, 426-428.
- Koyama, H., E. W. Raines, K. E. Bornfeldt, J. M. Roberts and R. Ross**, *Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of cdk2 inhibitors*, *Cell*, (1996), **87**, 1069-1078.
- Krude, T., M. Jackman, J. Pines and R. A. Laskey**, *Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system*, *Cell*, (1997), **88**, 109-119.
- LaBaer, J., M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow**, *New functional activities for the p21 family of Cdk inhibitors*, *Genes & Development*, (1997), **11**, 847-862.
- Lambert, C., Y. Massillon and S. Meloche**, *Upregulation of cardiac angiotensin II AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters*, *Circ. Res.*, (1995), **77**, 1001-1007.
- Lang, U. and M. B. Vallotton**, *Effects of angiotensin II and phorbol ester on protein kinase C activity and protacyclin production in cultured rat aortic smooth muscle cells*, *Biochem. J.*, (1989), **259**, 477-484.
- Laporte, S. and E. Escher**, *Neointima formation after vascular injury is angiotensin II mediated*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **187**, 1510-1516.

- Laporte, S. A., G. Servant, D. E. Richard, E. Escher, G. Guillemette and R. Leduc, *The tyrosine within the NPXnY motif of the human angiotensin II type 1 receptor is involved in mediating signal transduction but not essential for internalization*, *Mol. Pharmacol.*, (1996), **49**, 85-89.
- Larsson, R. and P. Cerutti, *Oxidants induce phosphorylation of ribosomal protein S6*, *J. Biol. Chem.*, (1988), **263**, 17452-17458.
- Lassègue, B., R. W. Alexander and M. Clark, *Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells*, *Biochem. J.*, (1993), **292**, 509-517.
- Lassègue, B., R. W. Alexander, M. Clark and K. K. Griendling, *Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth muscle cells: regulation and localization*, *Biochem. J.*, (1991), **276**, 19-25.
- Lavoie, J. N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller and J. Pouyssegur, *Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 20608-16.
- Leduc, I., P. Haddad, E. Giasson and S. Meloche, *Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells*, *Mol. Pharmacol.*, (1995a), **48**, 582-592.
- Leduc, I. and S. Meloche, *Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995b), **270**, 4401-4404.
- Lee, M., M. S. Dhahdly, D. Temizer, J. Clifford, M. Yoshizumi and T. Quertermous, *Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun*, *J. Biol. Chem.*, (1991), **266**, 19039-19043.
- Lee, M. H., I. Reynisdottir and J. Massagué, *Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and a tissue distribution*, *Genes Dev.*, (1995), **9**, 639-649.
- Leeb-Lundberg, L. M. F. and X. H. Song, *Bradykinin and bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-kDa group of proteins in Swiss 3T3 cells*, *J. Biol. Chem.*, (1991), **266**, 7746-7749.
- Lees, E., *Cyclin dependent kinase regulation*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, (1995), **7**, 773-780.

- Leeuw, T., C. Wu, J. D. Schrag, M. Whiteway, D. Y. Thomas and E. Leberer, *Interaction of a G-protein β -subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases*, *Nature*, (1998), **391**, 191-195.
- Leri, A., P. P. Claudio, Q. Li, X. Wang, K. Reiss, S. Wang, A. Malhotra, J. Kajstura and A. P., *Strech-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2to-Bax protein ratio in the cell*, *J. Clin. Invest.*, (1998), **101**, 1326-1342.
- Lev, S., H. Moreno, R. Martinez, P. Canoll, E. Peles, J. M. Musacchio, G. D. Plowman, B. Rudy and J. Schlessinger, *Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions*, *Nature*, (1995), **376**, 737-745.
- Lewis, J. L., T. Serikawa and D. G. Warnock, *Chromosomal localization of angiotensin II type 1 receptor isoform in the rat*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1993), **194**, 677-682.
- Li, J., H. Avraham, R. A. Rogers, S. Raja and S. Avraham, *Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes*, *Blood*, (1996), **88**, 417-428.
- Li, X. and H. S. Earp, *Paxillin is tyrosine-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 14341-8.
- Liao, D. F., J. L. Duff, G. Daum, S. L. Pelech and B. C. Berk, *Angiotensin II stimulates MAP kinase kinase kinase activity in vascular smooth muscle cells, Role of Raf*, *Circ. Res.*, (1996), **79**, 1007-14.
- Liao, D. F., B. Monia, N. Dean and B. C. Berk, *Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 6146-50.
- Lin, L. L., M. Wartmann, A. Y. Lin, J. L. Knopf, A. Seth and R. J. Davis, *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase*, *Cell*, (1993), **72**, 269-78.
- Lin, T. A., X. Kong, T. A. Haystead, A. Pause, G. Belsham, N. Sonenberg and J. C. Lawrence, Jr., *PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation [see comments]*, *Science*, (1994), **266**, 653-6.

- Lin, T. A., X. Kong, A. R. Saltiel, P. J. Blakeshear and J. C. J. Lawrence**, *Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes: Synthesis, degradation, and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 18531-18538.
- Linseman, D. A., C. W. Benjamin and D. A. Jones**, *Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 12563-8.
- Liscovitch, M.**, *Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases*, *Trends Biochem. Sci.*, (1992), **17**, 393-399.
- Liu, Y., A. Leri, B. Li, X. Wang, W. Cheng, J. Kajstura and P. Anversa**, *Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes*, *Circ. Res.*, (1998), **82**, 1145-1159.
- Liu, Y., J. L. Martindale, M. Gorospe and N. J. Holbrook**, *Regulation of p21WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway*, *Cancer Res.*, (1996), **56**, 31-5.
- Lloyd, A. C., F. Obermüller, S. Staddon, F. Barth, M. McMahon and H. Land**, *Co-operating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes*, *Genes Dev.*, (1997), **11**, 663-677.
- Low, B. C. and M. R. Grigor**, *Angiotensin II stimulates system y+ and cationic amino acid transporter gene expression in cultured vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 27577-83.
- Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg**, *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes*, *Mol. Cell. Biol.*, (1998), **18**, 753-761.
- Lyall, F., J. J. Morton, A. F. Lever and E. J. Cragoe**, *Angiotensin II activates Na⁺-H⁺ exchange and stimulates growth in cultured vascular smooth muscle cells*, *J. Hypertens.*, (1988), **6**, S438-S441.
- Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein and T. Jacks**, *p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage*, *Genes & Development*, (1995), **9**, 935-44.
- Makita, N., N. Iwai, T. Inagami and K. F. Badr**, *Two distinct pathways in the down-regulation of type-1 angiotensin II receptor gene in rat glomerular mesangial cells*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **185**, 142-146.

- Malarkey, K., C. M. Belham, A. Paul, A. Graham, A. McLees, P. H. Scott and R. Plevin**, *The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors*, *Biochem. J.*, (1995), **309**, 361-375.
- Mantel, C., Z. Luo, J. Canfield, S. Braun, C. Deng and H. E. Broxmeyer**, *Involvement of p21CIP1 and p27KIP1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21CIP1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo*, *Blood*, (1996), **88**, 3710-3719.
- Marie, J., B. Maigret, M. P. Joseph, R. Larguier, S. Nouet, C. Lombard and J. C. Bonnafous**, *Tyr²⁹² in the Seventh Transmembrane Domain of the AT_{1A} Angiotensin II Receptor Is Essential for Its Coupling to Phospholipase C*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 20815-20818.
- Marrero, M. B., W. G. Paxton, J. L. Duff, B. C. Berk and K. E. Bernstein**, *Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 10935-9.
- Marrero, M. B., B. Schieffer, B. Li, J. Sun, J. B. Harp and B. N. Ling**, *Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 24684-90.
- Marrero, M. B., B. Schieffer, W. G. Paxton, L. Heerdt, B. C. Berk, P. Delafontaine and K. E. Bernstein**, *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor*, *Nature*, (1995a), **375**, 247-250.
- Marrero, M. B., B. Schieffer, W. G. Paxton, E. Schieffer and K. E. Bernstein**, *Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits the angiotensin II activation of phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995b), **270**, 15734-8.
- Marshall, C. J.**, *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*, *Cell*, (1995), **80**, 179-185.
- Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marmé and C. Schächtele**, *Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 9194-9197.

- Masaki, H., T. Kurihara, A. Yamaki, N. Inomata, Y. Nozawa, Y. Mori, S. Murasawa, K. Kizima, K. Maruyama, M. Horiuchi, V. J. Dzau, H. Takahashi, T. Iwasaka, M. Inada and H. Matsubara, *Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects*, J. Clin. Invest., (1998), **101**, 527-535.
- Matsuoka, S., M. C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, J. W. Harper and S. J. Elledge, *p57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene*, Genes Dev., (1995), **9**, 650-662.
- Matsushime, H., D. E. Quelle, S. A. Shurtleff, M. Shibuya, C. J. Sherr and J.-Y. Kato, *D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells*, Mol. Cell. Biol., (1994), **14**, 2066-2076.
- Meloche, S., *Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition*, J. Cell. Physiol., (1995), **163**, 577-88.
- Meloche, S., K. Seuwen, G. Pages and J. Pouyssegur, *Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity*, Mol. Endocrinol., (1992), **6**, 845-54.
- Méthot, N., A. Pause, J. W. B. Hershey and N. Sonenberg, *The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleoprotein consensus sequence*, Mol. Cell. Biol., (1994), **14**, 2307-2316.
- Milarski, K. L. and A. R. Saltiel, *Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin*, J. Biol. Chem., (1994), **269**, 21239-21244.
- Molloy, C. J., D. S. Taylor and H. Weber, *Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells*, J. Biol. Chem., (1993), **268**, 7338-45.
- Monnot, C., C. Bihoreau, S. Conchon, K. M. Curnow, P. Corvol and E. Clauser, *Polar residues in the transmembrane domains of the type I angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants*, J. Biol. Chem., (1996), **271**, 1507-13.

- Morgan, D. O.**, *Principles of CDK regulation*, Nature, (1995), **374**, 131-134.
- Morishita, R., G. H. Gibbons, K. E. Ellison, M. Nakajima, H. von der Leyen, L. Zhang, Y. Kaneda, T. Ogihara and V. J. Dzau**, *Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk2 kinase oligonucleotides*, J. Clin. Invest., (1994), **93**, 1458-1464.
- Morton, J. J.**, *Biochemical aspects of the angiotensins*. The renin-angiotensin system. (J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls). Raven Press, New York, (1993), 9.1-9.12.
- Mukoyama, M., M. Horiuchi, M. Nakajima, R. E. Pratt and V. J. Dzau**, *Characterization of a rat type 2 angiotensin II receptor stably expressed in 293 cells*, Mol. Cell. Endocrinol., (1995), **112**, 61-68.
- Mukoyama, M., M. Nakajima, M. Horiuchi, H. Sasamura, R. E. Pratt and V. J. Dzau**, *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors*, J. Biol. Chem., (1993), **268**, 24539-24542.
- Murphy, T. J., R. W. Alexander, K. K. Griendling, M. S. Runge and K. E. Bernstein**, *Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor*, Nature, (1991), **351**, 233-236.
- Naftilan, A. J., G. K. Gilliland, C. S. Eldridge and A. Kraft**, *Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II*, Mol. Cell. Biol., (1990), **10**, 5536-5540.
- Naftilan, A. J., R. E. Pratt and V. J. Dzau**, *Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells*, J. Clin. Invest., (1989a), **83**, 1419-1424.
- Naftilan, A. J., R. E. Pratt, C. S. Eldridge, H. L. Lin and V. J. Dzau**, *Angiotensin II induces c-fos expression in smooth muscle via transcriptional control*, Hypertension, (1989b), **13**, 706-711.
- Nahmias, C., S. M. Cazaubon, M. M. Briend-Sutren, D. Lazard, P. Villageois and A. D. Strosbert**, *Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells*, Biochem. J., (1995), **306**, 87-92.
- Nahmias, C. and A. D. Strosberg**, *The angiotensin AT₂ receptor: searchnig for signal-transduction pathways and physiological function*, Trends Pharmacol. Sci., (1995), **16**, 223-225.

- Nakajima, M., H. G. Hutchinson, M. Fujinaga, W. Hayashida, R. Morishita, L. Zhang, M. Horiuchi, R. E. Pratt and V. J. Dzau,** *The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1995), **92**, 10663-7.
- Nakajima, M., M. Mukoyama, R. E. Pratt, M. Horiuchi and V. J. Dzau,** *Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1993), **197**, 393-399.
- Nakayama, K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D. Y. Loh and K.-I. Nakayama,** *Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors*, Cell, (1996), **85**, 707-720.
- Natarajan, A. J., N. Gonzales, P. J. Hornsby and J. Nadler,** *Mechanism of angiotensin II-induced proliferation in bovine adrenocortical cells*, Endocrinology, (1992), **131**, 1174-1180.
- Newton, A. C.,** *Regulation of protein kinase C*, Curr. Opin. Cell Biol., (1997), **9**, 161-167.
- Neyses, L., J. Nourskas and H. Vetter,** *Inhibition of endothelin-1 induced myocardial protein synthesis by an antisense oligonucleotide against the early growth response gene-1*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1991), **181**, 22-27.
- Nickenig, G. and T. J. Murphy,** *Down-regulation by growth factors of vascular smooth muscle angiotensin receptor gene expression*, Mol. Pharmacol., (1994), **46**, 653-659.
- Niimura, F. P. A., J. Labosky, J. Kakuchi, S. Okubo, H. Yoshida, T. Oikawa, T. Ichiki, A. Naftilan, J., A. Fogo, T. Inagami, B. L. M. Hogan and I. Ichikawa,** *Gene targeting reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth regulation*, J. Clin. Invest., (1995), **96**, 2947-2954.
- Nishikura, K. and J. M. Murray,** *Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells*, Mol. Cell. Biol., (1987), **7**, 639-649.
- Noda, A., Y. Ning, S. F. Venable, O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith,** *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*, Exp. Cell Res., (1994), **211**, 90-98.

- Noguchi, T., T. Matozaki, K. Horita, Y. Fujioja and M. Kasuga, *Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation*, Mol. Cell. Biol., (1994), **14**, 6674-6682.
- Nourse, J., E. Firpo, W. M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M. H. Lee, J. Massague, G. R. Crabtree and J. M. Roberts, *Interleukin-2-mediated elimination of the p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin*, Nature, (1994), **372**, 570-573.
- Ohnishi, J., M. Ishido, T. Shibata, T. Inagami, K. Murakami and H. Miyazaki, *The rat angiotensin II AT_{1A} receptor with three different signal transduction pathways*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1992), **186**, 1094-1101.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts and M. Pagano, *Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition*, Mol. Cell. Biol., (1995), **15**, 2612-2624.
- Okuda, M., Y. Kawahara, I. Nakayama, M. Hoshijima and M. Yokoyama, *Angiotensin II transduces its signal to focal adhesions via angiotensin II type 1 receptors in vascular smooth muscle cells*, FEBS Lett., (1995), **368**, 343-7.
- Okuda, M., Y. Kawahara and M. Yokoyama, *Angiotensin II type 1 receptor-mediated activation of Ras in cultured rat vascular smooth muscle cells*, Am. J. Physiol., (1996), **271**, H595-H601.
- Oppermann, M., N. J. Freedman, R. W. Alexander and R. J. Lefkowitz, *Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C*, J. Biol. Chem., (1996), **271**, 13266-72.
- Owens, G. K., A. A. T. Geisterfer, Y. W. H. Yang and A. Komoriya, *Transforming growth factor- β -induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells*, J. Cell Biol., (1988), **107**, 771-780.
- Page, I. H. and O. M. Helmer, *A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the action between renin and renin-activator*, Journal of Experimental Medicine, (1940), **71**, 29-42.
- Pages, G., P. Lenormand, G. L'Allemain, J. C. Chambard, S. Meloche and J. Pouyssegur, *Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993), **90**, 8319-23.

- Pang, L., T. Sawada, S. J. Decker and A. R. Saltiel**, *Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 13585-8.
- Paquet, J. L., M. Baudoin-Legros, G. Brunelle and P. Meyer**, *Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats*, *J. Hypertens.*, (1990), **8**, 565-572.
- Pardee, A. B.**, *G1 events and regulation of cell proliferation*, *Science*, (1989), **246**, 603-608.
- Parsons, J. T. and S. J. Parsons**, *Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signalling pathway*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, (1997), **9**, 187-192.
- Patton, W. F., H. Erdjument-Bromage, A. R. Marks, P. Tempst and M. B. Taubman**, *Components of the protein synthesis and folding machinery are induced in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic agents. Identification by comparative protein phenotyping and microsequencing*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 21404-10.
- Pause, A., G. J. Belsham, A. C. Gingras, O. Donze, T. A. Lin, J. C. Lawrence, Jr. and N. Sonenberg**, *Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function [see comments]*, *Nature*, (1994), **371**, 762-7.
- Pawson, T.**, *Protein modules and signalling networks*, *Nature*, (1995), **373**, 573-580.
- Peach, M. J.**, *Molecular actions of angiotensin*, *Biochem. Pharmacol.*, (1981), **30**, 2745-2751.
- Pimental, E. L.**, *Protein phosphorylation. Growth factors*. (E. Pimentel). CRC Press, Boca Raton, (1994), 207-266.
- Pleiman, C. M., M. R. Clark, L. K. Gauen, S. Winitz, K. M. Coggeshall, G. L. Johnson, A. S. Shaw and J. C. Cambier**, *Mapping of sites on the Src family protein tyrosine kinases p55blk, p59fyn, and p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C-gamma 2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase*, *Mol. Cell. Biol.*, (1993), **13**, 5877-5887.
- Polte, T. R., A. J. Naftilan and S. K. Hanks**, *Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II*, *J. Cell. Biochem.*, (1994), **55**, 106-19.

- Polyak, K., J. Y. Kato, M. J. Solomon, C. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts and A. Koff, *p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest*, *Genes Dev.*, (1994b), **8**, 9-22.
- Polyak, K., M. H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J. M. Roberts, P. Tempst and J. Massagué, *Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*, *Cell*, (1994a), **78**, 59-66.
- Poon, R. Y. C. and T. Hunter, *Dephosphorylation of Cdk2 Thr¹⁶⁰ by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin*, *Science*, (1995), **270**, 90-93.
- Poon, R. Y. C., W. Jiang, H. Toyoshima and T. Hunter, *Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 13283-13291.
- Powell, J. S., J.-P. Clozel, R. K. M. Muller, H. Kuhn, F. Hefti, M. Hosang and H. R. Baumgartner, *Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury*, *Science*, (1989), **245**, 186-188.
- Pratt, R. E. and V. J. Dzau, *Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system*. *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System*. (M. K. Raizada, M. I. Phillips and C. Summers). CRC Press, Inc., Boca Raton, (1993), 471-483.
- Proud, C. G. and R. M. Denton, *Molecular mechanisms for the control of translation by insulin*, *Biochem. J.*, (1997), **328**, 329-41.
- Pullen, N., P. B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S. C. Kozma, B. A. Hemmings and G. Thomas, *Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1*, *Science*, (1998), **279**, 707-710.
- Pullen, N. and G. Thomas, *The molecular phosphorylation and activation of p70s6k*, *FEBS Lett.*, (1997), **410**, 78-82.
- Pumiglia, K. M. and S. J. Decker, *Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997), **94**, 448-52.
- Pumiglia, K. M., H. LeVine, T. Haske, T. Habib, R. Jove and S. J. Decker, *A direct interaction between G-protein $\beta\gamma$ subunits and the Raf-1 protein kinase*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 14251-14254.

- Rao, G. N., A. S. Baas, W. C. Glasgow, T. E. Eling, M. S. Runge and R. W. Alexander**, *Activation of mitogen-activated protein kinases by arachidonic acid and its metabolites in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1994c), **269**, 32586-32591.
- Rao, G. N. and B. C. Berk**, *Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression*, *Circ. Res.*, (1992), **70**, 593-599.
- Rao, G. N., P. Delafontaine and M. S. Runge**, *Thrombine stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma in rat aortic smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 27871-27875.
- Rao, G. N., K. K. Griendling, R. M. Frederickson, N. Sonenberg and R. W. Alexander**, *Angiotensin II induces phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1994a), **269**, 7180-4.
- Rao, G. N., B. Lassegue, R. W. Alexander and K. K. Griendling**, *Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells*, *Biochem. J.*, (1994b), **299**, 197-201.
- Rao, G. N., C. Sardet, J. Pouysségur and B. C. Berk**, *Differential regulation of Na⁺/H⁺ antiporter gene expression in vascular smooth muscle cells by hypertrophic and hyperplastic stimuli.*, *J. Biol. Chem.*, (1990), **265**, 19393-19396.
- Redpath, N. T. and C. G. Proud**, *Molecular mechanisms in the control of translation by hormones and growth factors*, *Biochim. Biophys. Acta*, (1994), **1220**, 147-162.
- Reid, I. A.**, *Vasoactive peptides*. Basic & clinical pharmacology. (B. G. Katzung). Appleton & Lange, East Norwalk, (1995), 276-289.
- Reynisdottir, I. and J. Massagué**, *The subcellular locations of p15Ink4b and p27Kip1 coordinate their inhibitory interactions with Cdk4 and Cdk2*, *Genes & Development*, (1997), **11**, 492-503.
- Reynisdottir, I., K. Polyak, A. Iavarone and J. Massagué**, *Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β* , *Genes Dev.*, (1995), **9**, 1831-1845.

- Ridley, A. J., H. F. Paterson, M. Noble and H. Land**, *Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation*, EMBO J., (1988), **7**, 1635-1645.
- Rivard, N., G. L'Allemain, J. Bartek and J. Pouyssegur**, *Abrogation of p27^{Kip1} by cDNA antisens suppresses quiescence (G₀ state) in fibroblasts.*, J. Biol. Chem., (1996), **271**, 18337-18341.
- Rivera, V. M., C. K. Miranti, R. P. Misra, D. D. Ginty, R. H. Chen, J. Blenis and M. E. Greeberg**, *A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity*, Mol. Cell. Biol., (1993), **13**, 6260-6273.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb**, *Mitogen-activated protein kinase pathways*, Curr. Opin. Cell Biol., (1997), **9**, 180-186.
- Rodriguez-Linares, B. and S. P. Watson**, *Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets*, FEBS Lett., (1994), **352**, 335-338.
- Rodriguez-Viciano, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield and J. Downward**, *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*, Nature, (1994), **370**, 527-532.
- Rothman, A., B. Wolner, D. Button and P. Taylor**, *Immediate-early gene expression in response to hypertrophic and proliferative stimuli in pulmonary arterial smooth muscle cells*, J. Biol. Chem., (1994), **269**, 6399-6404.
- Sachinidis, A., Y. Ko, W. Nettekoven, A. J. Wieczorek, R. Düsing and H. Vetter**, *The effect of angiotensin II on DNA synthesis varies considerably in vascular smooth muscle cells from different Wistar-Kyoto rats*, J. Hypertens., (1992b), **10**, 1159-1164.
- Sachinidis, A., P. Weisser, Y. Ko, K. Schulte, K. Meyer zu Brickwedde, L. Neyses and H. Vetter**, *Angiotensin II induces formation of the early growth response gene-1 protein in rat vascular smooth muscle cells*, Federation of European Biochemical Societies, (1992a), **313**, 109-112.
- Sadoshima, J. and S. Izumo**, *Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype*, Circ. Res., (1993), **73**, 413-23.

- Sadoshima, J. and S. Izumo**, *Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. Potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*, *Circ. Res.*, (1995), **77**, 1040-52.
- Sasaki, H., K. Nagura, M. Ishino, H. Tobioka, K. Kotani and T. Sasaki**, *Cloning and characterization of cell adhesion kinase β , a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 21206-21219.
- Sasaki, K., Y. Yamano, S. Bardhan, N. Iwai, J. J. Murray, M. Hasegawa, Y. Matsuda and T. Inagami**, *Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor*, *Nature*, (1991), **351**, 230-233.
- Sasamura, H., L. Hein, J. E. Krieger, R. E. Pratt, B. K. Kobilka and V. J. Dzau**, *Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **185**, 253-259.
- Savarese, T. M. and C. M. Fraser**, *In vitro mutagenesis and the search of structure-function relationships among G protein-coupled receptors*, *Biochem. J.*, (1992), **283**, 1-19.
- Schalekamp, M. A. D. H. and F. H. M. Derkx**, *Renal action of angiotensin II in man: normal and abnormal*. The renin-angiotensin system. (J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls). Raven Press, New York, (1993), 27.1-27.9.
- Schelling, P., H. Fischer and D. Ganten**, *Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?*, *J. Hypertens.*, (1991), **9**, 3-15.
- Schieffer, B., W. G. Paxton, Q. Chai, M. B. Marrero and K. E. Bernstein**, *Angiotensin II controls p21ras activity via pp60c-src*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 10329-33.
- Schönwasser, D. C., R. M. Marais, C. J. Marshall and P. J. Parker**, *Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes*, *Mol. Cell. Biol.*, (1998), **18**, 790-798.
- Schorb, W., G. W. Booz, D. E. Dostal, K. M. Conrad, K. C. Chang and K. M. Baker**, *Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts*, *Circ. Res.*, (1993), **72**, 1245-1254.
- Schwartz, S. M., D. de Blois and E. R. M. O'Brien**, *The Intima: Soil for Atherosclerosis and Restenosis*, *Circ. Res.*, (1995), **77**, 445-465.

- Scimeca, J. C., M. J. Servant, J. O. Dyer and S. Meloche, *Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression*, *Oncogene*, (1997), **15**, 717-25.
- Scialfani, R. A., *Cyclin dependent kinase activating kinases*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, (1996), **8**, 788-794.
- Seeger, R. and E. G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*, *FASEB J.*, (1995), **9**, 726-735.
- Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*, *Nature*, (1993), **366**, 704-707.
- Servant, G., D. T. Dudley, E. Escher and G. Guillemette, *Analysis of the role of N-glycosylation in cell-surface expression and binding properties of angiotensin II type-2 receptor of rat pheochromocytoma cells*, *Biochem. J.*, (1996), **313**, 297-304.
- Sewing, A., B. Wiseman, A. C. Lloyd and H. Land, *High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1*, *Molecular and Cellular Biology*, (1997), **17**, 5588-5597.
- Shankland, S. J., J. Pippin, M. Flanagan, S. R. Coats, M. Nangaku, K. L. Gordon, J. M. Roberts, W. G. Couser and R. J. Johnson, *Mesengial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinases inhibitor p27^{Kip1}*, *Kidney Int.*, (1997), **51**, 1088-1099.
- Sheaff, R. J., M. Groudine, M. Gordon, J. M. Roberts and B. E. Clurman, *Cyclin E-Cdk2 is a regulator of p27^{Kip1}*, *Genes Dev.*, (1997), **11**, 1464-1478.
- Sheng, M., M. A. Thompson and M. E. Greenberg, *CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases*, *Science*, (1991), **252**, 1427-1430.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts, *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases*, *Genes Dev.*, (1995), **9**, 1149-1163.
- Shimomura, A., Y. Ogawa, T. Kitani, H. Fujisawa and M. Hagiwara, *Calmodulin-dependent 2protein kinase II potentiates transcriptional activation through activating transcription factor I but not cAMP response element-binding protein*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 17957-17960.

- Slingerland, J. M., L. Hengst, C. H. Pan, D. Alexander, M. R. Stampfer and S. I. Reed**, *A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells*, *Mol. Cell. Biol.*, (1994), **14**, 3683-3694.
- Smith, J. B.**, *Angiotensin-receptor signalling in cultured vascular smooth muscle cells*, *Am. J. Physiol.*, (1986), **250**, F759-F769.
- Socorro, L., R. W. Alexander and K. K. Griendling**, *Cholera toxin modulation of angiotensin II-stimulated inositol phosphate production in cultured vascular smooth muscle cells*, *Biochem. J.*, (1990), **265**, 799-807.
- Soos, T. J., H. Kiyokawa, J. S. Yan, M. S. Rubin, A. Giordano, A. DeBlasio, S. Bottega, B. Wong, J. Mendelsohn and A. Koff**, *Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle*, *Cell Growth Differ.*, (1996), **7**, 135-146.
- Sorkin, A. and C. M. Waters**, *Endocytosis of growth factor receptors*, *BioEssays*, (1993), **15**, 375-382.
- Spiegel, A. M., A. Shenker and L. S. Weinstein**, *Receptor-effector coupling by G proteins: Implications for normal and abnormal signal transduction*, *Endocr. Rev.*, (1992), **13**, 536-565.
- Squire, I. B. and J. L. Reid**, *Interaction between the renin-angiotensin system and the autonomic nervous system*. The renin-angiotensin system. (J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls). Raven Press, New York, (1993), 37.1-37.16.
- Stacey, D. W. and H. F. Kung**, *Transformation of NIH-3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein.*, *Nature*, (1984), **310**, 508-511.
- Stephens, L., A. Smrcka, F. T. Cooke, T. R. Jackson, P. C. Sternweis and P. T. Hawkins**, *A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits*, *Cell*, (1994), **77**, 83-93.
- Stiles, C. D., G. T. Capone, C. D. Scher, H. N. Antoniades, J. J. Van Wyk and W. J. Pledger**, *Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1979), **76**, 1279-1284.
- Stokoe, D., L. R. Stephens, T. Copeland, P. R. Gaffney, C. B. Reese, G. F. Painter, A. B. Holmes, F. McCormick and P. T. Hawkins**, *Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B*, *Science*, (1997), **277**, 567-570.

- Stoll, M., M. Steckelings, S. P. Bottari, R. Metzger and T. Unger,** *The Angiotensin AT₂-Receptor Mediates Inhibition of Cell Proliferation in Coronary Endothelial Cells*, *J. Clin. Invest.*, (1995), **95**, 651-657.
- Stouffer, G. A. and G. K. Owens,** *Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor- β* , *Circ. Res.*, (1992), **70**, 820-828.
- Stouffer, G. A., R. T. Shimizu, M. B. Turla and G. K. Owens,** *Ang II- or AVP-induced increases in protein synthesis are not dependent on autocrine secretion of PDGF-AA*, *Am. J. Physiol.*, (1993), **264**, C390-C395.
- Su, E. J., D. M. Lombardi, J. Wiener, M. J. Daemen, M. A. Reidy and S. M. Schwartz,** *Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or II mesenteric microvessels but not type I microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast factor*, *Circ. Res.*, (1998), **82**, 321-327.
- Sugaya, T., S. Nishimatsu, K. Tanimoto, E. Takimoto, T. Yamagishi, K. Imamura, S. Goto, K. Imaizumi, Y. Hisada, A. Otsuka, H. Uchida, M. Sugiura, K. Fukuta, A. Fukamizu and K. Murakami,** *Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 18719-18722.
- Sun, H., C. H. Charles, L. F. Lau and N. K. Tonks,** *MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo*, *Cell*, (1993), **75**, 487-93.
- Sun, H., N. K. Tonks and D. Bar-Sagi,** *Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1*, *Science*, (1994c), **266**, 285-8.
- Sun, P., H. Enslin, P. S. Myung and R. A. Maurer,** *Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity*, *Genes Dev.*, (1994b), **8**, 2527-2539.
- Sun, Y. and K. T. Weber,** *Angiotensin II receptors binding following myocardial infarction in the rat*, *Cardiovasc. Res.*, (1994a), **28**, 1623-1628.
- Szpirer, C., M. Riviere, J. Szpirer, G. Levan, D. F. Guo, N. Iwai and T. Inagami,** *Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type I angiotensin II receptor genes and SA gene*, *J. Hypertens.*, (1993), **11**, 919-925.

- Takahashi, E., J. Abe and B. C. Berk**, *Angiotensin II stimulates p90rsk in vascular smooth muscle cells. A potential Na(+)-H+ exchanger kinase*, *Circ. Res.*, (1997b), **81**, 268-73.
- Takahashi, T., Y. Kawahara, M. Okuda, H. Ueno, A. Takeshita and M. Yokoyama**, *Angiotensin II stimulates mitogen-activated protein kinases and protein synthesis by a Ras-independent pathway in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1997a), **272**, 16018-22.
- Tanimoto, K., F. Sugiyama, Y. Goto, J. Ishida, E. Takimoto, K. Yagami, A. Fukamizu and K. Murakami**, *Angiotensinogen-deficient mice with hypotension*, *J. Biol. Chem.*, (1994), **269**, 31334-31337.
- Tanner, F. C., Z.-Y. Yang, E. Duckers, D. Gordon, G. J. Nabel and E. G. Nabel**, *Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease*, *Circ. Res.*, (1998), **82**, 396-403.
- Taubman, M. B., B. C. Berk, S. Izumo, T. Tsuda, R. W. Alexander and B. Nadal-Ginard**, *Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle*, *J. Biol. Chem.*, (1989), **264**, 526-530.
- Teutsch, B., C. Bihoreau, C. Monnot, K. E. Bernstein, T. J. Murphy, R. W. Alexander, P. Corvol and E. Clauser**, *A recombinant rat vascular AT₁ receptor confers growth properties to angiotensin II in Chinese hamster ovary cells*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **187**, 1381-1388.
- Thomas, W. G., K. M. Baker, T. J. Motel and T. J. Thekkumkara**, *Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic face of a putative amphipathic helix*, *J. Biol. Chem.*, (1995), **270**, 22153-9.
- Thyberg, J.**, *Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture*, *Int. Rev. Cytol.*, (1996), **169**, 183-265.
- Tigerstedt, R. and P. G. Bergman**, *Niere und kreislauf*, *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, (1898), **8**, 223-271.
- Timmermans, P. B. M. W. M., P. C. Wong, A. T. Chiu, W. F. Herblin, P. Benfield, D. J. Carini, R. J. Lee, R. R. Wexler, J. A. M. Saye and R. D. Smith**, *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists*, *Pharmacol. Rev.*, (1993), **45**, 205-251.
- Toda, N.**, *Endothelium-dependent relaxation induced by angiotensin II and histamin in isolated arteries of dog*, *Br. J. Pharmacol.*, (1984), **81**, 301-307.

- Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, L. Duhamel, D. Charon and J. Kirilovsky, *The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C*, J. Biol. Chem., (1991), **266**, 15771-15781.**
- Toyoshima, H. and T. Hunter, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*, Cell, (1994), **78**, 67-74.**
- Traverse, S., N. Gomez, H. Paterson, C. Marshall and P. Cohen, *Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor*, Biochem. J., (1992), **288**, 351-5.**
- Tsai, L.-H., E. Lees, B. Faha, E. Harlow and K. Riabowol, *The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells*, Oncogene, (1993), **8**, 1593-1602.**
- Tsuchida, S., T. Matsusaka, X. Chen, S. Okubo, F. Niimura, H. Nishimura, A. Fogo, H. Utsunomiya, T. Inagami and I. Ichikawa, *Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes*, Journal of Clinical Investigations, (1998), **101**, 755-760.**
- Tsuda, T., Y. Kawahara, Y. Ishida, M. Koide, K. Shii and M. Yokoyama, *Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells*, Circ. Res., (1992), **71**, 620-630.**
- Tsuzuki, S., T. Ichiki, H. Nakakubo, Y. Kitamio, D. F. Guo, H. Shirai and T. Inagami, *Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor*, Biochem. Biophys. Res. Commun., (1994), **200**, 1449-1454.**
- Turla, M. B., M. M. Thompson, M. H. Corjay and G. K. Owens, *Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. Evidence for selective increases in smooth muscle isoactin expression*, Circ. Res., (1991), **68**, 288-99.**
- Turner, C. E., K. M. Pietras, D. S. Taylor and C. J. Molloy, *Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells*, J. Cell Sci., (1995), **108**, 333-342.**

- Uehara, Y., H. Fukazawa, Y. Murakami and S. Mizuno,** *Irreversible inhibition of v-src tyrosine kinase activity by herbimycin A and its abrogation by sulfhydryl compounds*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1989), **163**, 803-809.
- Ullian, M. E. and S. L. Linas,** *Angiotensin II surface receptor coupling to inositol trisphosphate formation in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1990), **265**, 195-200.
- Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, T. Fukui, N. Ishizaka and K. K. Griending,** *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 23317-21.
- van den Heuvel, S. and E. Harlow,** *Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control*, *Science*, (1993), **262**, 2050-2054.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, G. Panatou and M. D. Waterfield,** *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers*, *Trends Biochem. Sci.*, (1997), **22**, 267-272.
- Vanhoutte, P. M., C. M. Boulanger, M. Vidal and J.-V. Momboule,** *Endothelium-derived mediators and the renin-angiotensin system. The renin-angiotensin system.* (J. I. S. Robertson and M. G. Nicholls). Raven Press, New York, (1993), 29.1-29.15.
- Vlach, J., S. Hennecke, K. Alevizopoulos, D. Conti and B. Amati,** *Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc*, *EMBO J.*, (1996), **15**, 6595-6604.
- Vlach, J., S. Hennecke and B. Amati,** *Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}*, *EMBO J.*, (1997), **16**, 5334-5344.
- von Manteuffel, S. R., A. C. Gingras, X. F. Ming, N. Sonenberg and G. Thomas,** *4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1996), **93**, 4076-80.
- Wang, X., G. Nickenig and T. J. Murphy,** *The vascular smooth muscle type 1 angiotensin II receptor mRNA is destabilized by cyclic AMP-elevating agents*, *Mol. Pharmacol.*, (1997), **52**, 781-787.

- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, C. G. Proud and J. A. Cooper, *Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2*, EMBO J., (1997), **16**, 1909-20.
- Weber, H., D. S. Taylor and C. J. Molloy, *Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells*, J. Clin. Invest., (1994a), **93**, 788-798.
- Weber, H., M. L. Webb, R. Serafino, D. S. Taylor, S. Moreland, J. Norman and C. J. Molloy, *Endothelin-1 and angiotensin-II stimulate delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for common signaling mechanisms*, Mol. Endocrinol., (1994b), **8**, 148-158.
- Weber, J. D., W. Hu, S. C. Jefcoat, Jr., D. M. Raben and J. J. Baldassare, *Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27*, J. Biol. Chem., (1997a), **272**, 32966-71.
- Weber, J. D., D. M. Raben, P. J. Phillips and J. J. Baldassare, *Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase*, Biochem. J., (1997b), **326**, 61-8.
- Wen, Z., Z. Zhong and J. E. Darnell Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*, Cell, (1995), **82**, 241-250.
- Winston, J., F. Dong and W. J. Pledger, *Differential modulation of G₁ cyclins and the cdk inhibitor p27^{kip1} by platelet-derived growth factor and plasma factors in density-arrested fibroblasts*, J. Biol. Chem., (1996a), **271**, 11253-11260.
- Winston, J. T., S. R. Coats, Y.-Z. Wang and W. J. Pledger, *Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras*, Oncogene, (1996b), **12**, 127-134.
- Won, K.-A. and S. I. Reed, *Activation of cyclin E/Cdk2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E*, EMBO J., (1996), **15**, 4182-4193.
- Woods, D., D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees and M. M., *Raf-induced proliferation of cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1*, Mol. Cell. Biol., (1997), **17**, 5598-5611.

- Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zang, D. Casso, R. Kobayasi and D. Beach**, *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*, *Nature*, (1993), **366**, 701-704.
- Xu, Q., Y. Liu, M. Gorospe, R. Udelsman and N. J. Holbrook**, *Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall*, *J. Clin. Invest.*, (1996), **97**, 508-514.
- Yamano, Y., K. Ohyama, S. Chaki, D. F. Guo and T. Inagami**, *Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1992), **187**, 1426-1431.
- Yamauchi, K., K. L. Milarski, A. R. Saltiel and J. E. Pessin**, *Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995), **92**, 664-668.
- Yan, Y., J. Frisen, M. H. Lee, J. Massagué and M. Barbacid**, *Ablation of the Cdk inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development*, *Genes & Development*, (1997), **11**, 973-983.
- Yang, Z., B. S. Oemar, T. Carrel, B. Kipfer, F. Julmy and T. F. Lüscher**, *Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels*, *Circulation*, (1998), **97**, 181-187.
- Yen, M. H., Y. Z. Sheu, W. F. Chiou and C. C. Wou**, *Differential modulation by basilar and mesenteric endothelium-dependent modulation of angiotensin II-induced contraction in canine arteries*, *Eur. J. Pharmacol.*, (1990), **180**, 209-216.
- Yu, H., X. Li, G. S. Marchetto, R. Dy, D. Hunter, B. Calvo, T. L. Dawson, M. Wilm, R. J. Anderegg, L. M. Graves and H. S. Earp**, *Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation*, *J. Biol. Chem.*, (1996), **271**, 29993-8.
- Yu, S. S., R. J. Lefkowitz and W. P. Hausdorff**, *β -adrenergic receptor sequestration*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 337-341.
- Zachary, I., J. Gil, W. Lehmann, J. Sinnott-Smith and E. Rozengurt**, *Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation in intact Swiss 3T3 cells*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1991), **88**, 4577-4581.

- Zhang, H., G. J. Hannon and D. Beach**, *p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states*, *Genes & Development*, (1994), **8**, 1750-8.
- Zhang, H., Y. Xiong and D. Beach**, *Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle complexes*, *Mol. Cell. Biol.*, (1993), **4**, 897-906.
- Zhang, P., N. J. Liegeois, C. Wong, M. Finegold, H. Hou, J. C. Thompson, A. Silverman, J. W. Harper, R. A. DePinho and S. J. Elledge**, *Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57kip2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome*, *Nature*, (1997), **387**, 151-158.
- Zheng, C.-F. and K.-L. Guan**, *Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 16116-16119.
- Zohn, I. E., H. Yu, X. Li, A. D. Cox and H. S. Earp**, *Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase*, *Mol. Cell. Biol.*, (1995), **15**, 6160-8.

ANNEXE

Culture cellulaire ces CMLV:

Les CMLV ont été isolées à partir de rats mâle Brown-Norway de 12 semaines par la technique d'explant. Les cellules étaient cultivées dans un milieu "low-glucose Dulbecco's modified Eagle's" supplémenté avec 10% sérum de veau, 2mM L-glutamine, et antibiotiques (50 µg/ml streptomycine et 50 unités/ml pénicilline) et étaient utilisées entre les passages 9 et 16. Les CMLV quiescentes étaient obtenues en incubant des cellules à 80-90% de confluence dans un milieu sans sérum "Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 (1:1) contenant 15 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% albumine bovine et 5 µg/ml de transferrine pour 48 heures.

**Récepteurs de l'angiotensine II: rôles dans le contrôle
de la croissance cellulaire et mécanismes de
transmission du signal**

Récepteurs de l'angiotensine II : rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal

Catherine Chassagne
Marc J. Servant
Sylvain Meloche

L'angiotensine II est une hormone peptidique qui exerce une multitude d'actions biologiques au niveau du système cardio-vasculaire, du rein et du système nerveux central. Les effets de l'hormone sont relayés par deux sous-types de récepteurs, AT₁ et AT₂, appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Outre ses effets classiques, l'angiotensine II stimule la croissance de divers types cellulaires, notamment les myocytes cardiaques et les cellules musculaires lisses vasculaires. Dans ces dernières, cet effet hypertrophique est relayé par le récepteur AT₁, puis par plusieurs seconds messagers et un réseau complexe d'au moins trois cascades de protéine kinases : la p70 S6 kinase, les MAP kinases ERK1/ERK2 et une tyrosine kinase. A l'inverse, des travaux récents suggèrent que la liaison de l'Ang II au récepteur de sous-type AT₂ pourrait exercer un effet inhibiteur sur la croissance de certaines cellules. Les mécanismes par lesquels le signal du récepteur AT₂ est transmis restent cependant inconnus.

ADRESSE

C. Chassagne: stagiaire postdoctorale. M.J. Servant: étudiant en doctorat. S. Meloche: chercheur agrégé. Centre de recherche, Hôtel-Dieu de Montréal et département de pharmacologie, université de Montréal, 3850, rue Saint-Urbain, Montréal, Québec, H2W 1T8 Canada.

m/s n° 12, vol. 12, décembre 96

L'angiotensine II (Ang II), principal médiateur du système rénine-angiotensine (SRA), exerce une action vasoconstrictrice sur l'ensemble du réseau artériel, tant périphérique que coronaire, contrôlant ainsi la pression artérielle. Elle contribue également à la régulation de certaines fonctions cellulaires

périphériques, comme la réabsorption rénale de sodium, la contraction des myocytes cardiaques et des cellules musculaires lisses (CML), la libération d'aldostérone par la cortico-surrénale, de peptides vasoactifs par l'endothélium vasculaire, et de catécholamines au niveau du système nerveux autonome sympathique [1]. Dans le système nerveux central, elle

RÉFÉRENCES

1. Brooks DP, Ruffolo RR Jr. Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. In : Ruffolo RR Jr. ed. *Angiotensin II Receptors. Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Perspectives*. Boca Raton : CRC Press Inc, 1994 : 71-102.
2. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth : a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991 ; 9 : 3-15.
3. Pratt RE, Dzau VJ. Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system. In : Raizada MK, Phillips MI, Summers C, eds. *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System*. Boca Raton : CRC Press Inc., 1993 : 471-83.
4. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993 ; 45 : 205-51.
5. Inagami T, Mizukoshi M, Guo DF. Angiotensin II receptor : molecular cloning, functions, and regulation. In : Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin receptors*. New York : Plenum Press, 1994 : 1-15.
6. De Gasparo M, Levens NR, Kamber B, et al. The angiotensin II AT₂ receptor subtype. In : Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin Receptors*. New York : Plenum Press, 1994 : 95-117.
7. Nahmias C, Strosberg AD. The angiotensin AT₂ receptor : searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1995 ; 16 : 223-5.
8. Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992 ; 6 : 1113-8.
9. Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, Guo DF, Inagami T. Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 187 : 1426-31.
10. Chassagne C, Beatty BG, Meloche S. Assignment of the human angiotensin-II type 2 receptor gene (*AGTR2*) to chromosome Xq22-q23 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 1995 ; 25 : 601-3.
11. Ohyama K, Yamano Y, Chaki S, Kondo T, Inagami T. Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor Type 1 : studies by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 189 : 677-83.
12. Bihoreau C, Monnot C, Davies E, et al. Mutation of Asp⁷⁴ of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 5133-7.
13. Metsärinne KP, Stoll M, Falkenhahn M, Gohlke P, Unger T. Inhibiting the effects of angiotensin on cardiovascular hypertrophy. In : Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin receptors*. New York : Plenum Press, 1994 : 235-53.

provoque la libération de vasopressine et de catécholamines, et a des effets sur la soif et sur le comportement. Outre ces effets classiques, l'Ang II stimule la croissance de plusieurs types de cellules, dont les CML vasculaires (CMLV), les cellules corticosurrénales, les fibroblastes et les myocytes cardiaques, les cellules mésangiales et les cellules endothéliales de la microvascularisation coronaire [2, 3]. Dans cette revue, nous ferons le point sur le rôle des sous-types du récepteur de l'Ang II dans le contrôle de la croissance cellulaire et sur les mécanismes associés à cette réponse.

Les récepteurs de l'Ang II : caractérisation, distribution tissulaire et structure

Les effets de l'Ang II sur les systèmes cardio-vasculaire, endocrine et nerveux dépendent de sa liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. Les deux sous-types majeurs

du récepteur de l'Ang II, AT₁ et AT₂, ont été identifiés notamment grâce à l'utilisation d'antagonistes non peptidiques sélectifs : le losartan (DuP 753), un dérivé biphenyltétrazole, pour le sous-type AT₁, et le PD123319, de la famille des tétrahydro-imidazopyridines, pour le sous-type AT₂ [4, 5]. D'autres critères de classification, comprenant principalement la sensibilité aux agents réducteurs et le couplage à divers seconds messagers, sont résumés dans le *Tableau I*. Ces critères ont permis de dresser une carte de la distribution des récepteurs AT₁ et AT₂. Ainsi, chez diverses espèces adultes (homme, singe, bœuf, lapin, rat), le récepteur AT₁ est majoritaire dans un grand nombre de tissus ou d'organes incluant l'aorte, les artères pulmonaires et rénales, d'une façon plus générale les muscles lisses vasculaires, le cœur, les poumons, les cortex rénal et surrénal, le cerveau et le foie. C'est le récepteur AT₁ qui relaie la majorité des effets physiologiques de l'Ang II, incluant ceux sur la croissance cellu-

Tableau I
PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES
DES SOUS-TYPES DE RÉCEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II

	AT ₁	AT ₂
Ordre de puissance	Saralazine > All > AllI	AllI ≥ 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 ; AllI = angiotensine III.

laire [1, 4]. A l'opposé, chez l'adulte, la synthèse du récepteur AT_2 est restreinte : elle se retrouve essentiellement dans la médullosurrénale, l'appareil reproducteur féminin (myomètre utérin, trompes de Fallope et ovaires) et des régions définies du cerveau. Cette localisation spécifique, associée au fait que certaines réponses à l'Ang II, telles les sécrétions de prolactine et d'hormone lutéinisante, la dilatation des artérioles cérébrales ou la soif chez le rat sont inhibées *in vivo* par des antagonistes sélectifs du sous-type AT_2 , suggère que le récepteur AT_2 pourrait jouer un rôle dans les fonctions cérébrales et de reproduction chez l'adulte [4, 6].

Le clonage moléculaire des ADN complémentaires codant pour les récepteurs AT_1 en 1991 [5] et AT_2 en 1993 [7] a révélé que ces récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (figure 1). Ces récepteurs sont généralement caractérisés par leur couplage aux protéines G hétérotrimériques. Suite au clonage du récepteur AT_1 bovin et de rat, une seconde isoforme, désignée AT_{1B} , a été isolée chez le rat et la souris [5]. Les deux isoformes du récepteur AT_1 , AT_{1A} et AT_{1B} , sont très semblables, partageant 95 % d'analogie au niveau de la séquence protéique. Contrairement à celui des rongeurs, le génome humain contient un seul gène codant pour le récepteur AT_1 , localisé sur le chromosome 3q21-3q25 [8]. Le récepteur AT_1 est constitué de 359 acides aminés avec une masse moléculaire déduite de 41 kDa. Cependant, la masse moléculaire observée est d'environ 65 kDa, résultat de la glycosylation de la protéine. En effet, trois sites consensus de N-glycosylation sont présents dans les boucles extracellulaires du récepteur (figure 1). Cette glycosylation n'apparaît cependant pas nécessaire à la liaison de l'Ang II, car la mutation des résidus asparagine en résidus acide aspartique n'a aucun effet sur l'affinité du récepteur [9]. Les quatre régions extracellulaires contiennent également des résidus cystéine dont la mutation en résidus glycine réduit considérablement l'affinité du récepteur AT_1 pour l'Ang II [9]. Le récepteur AT_2 est lui aussi codé par un gène unique chez l'homme,

m/s n° 12, vol. 12, décembre 96

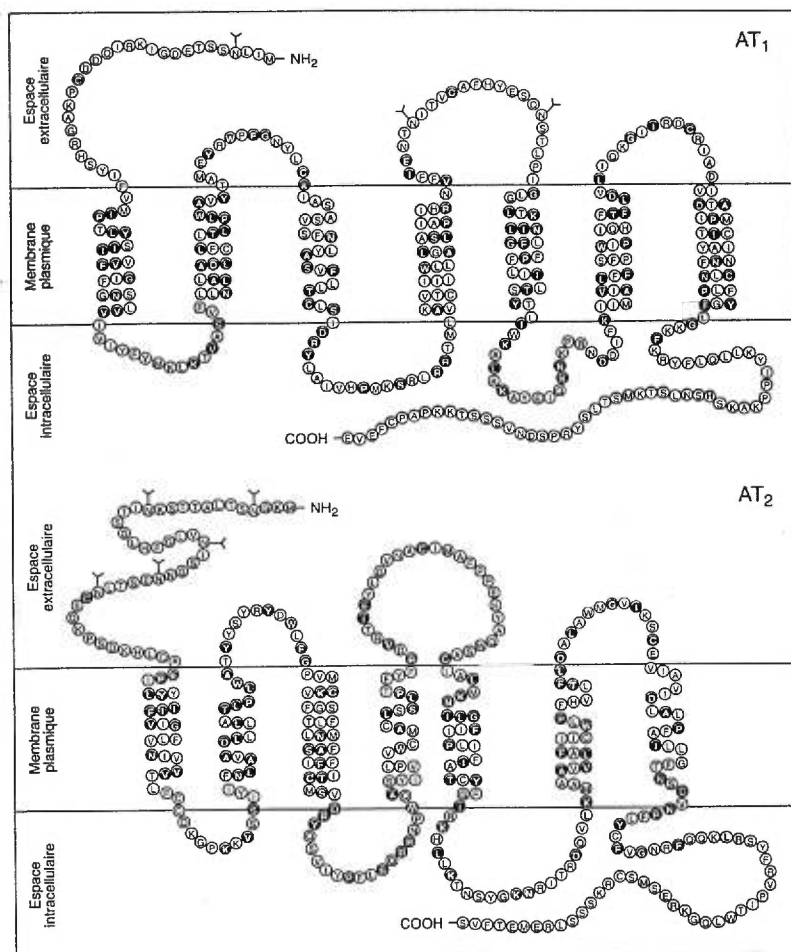


Figure 1. Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II. Les séquences humaines des sous-types AT_1 et AT_2 des récepteurs de l'Ang II sont présentées. Les résidus identiques entre les deux protéines sont indiqués par des cercles rouges. Les sites de N-glycosylation sont représentés par le signe Y (en rouge).

dont le produit est une protéine de 363 acides aminés avec une masse moléculaire déduite de 41,3 kDa. La variabilité du poids moléculaire du récepteur selon les tissus ou les cellules serait, comme pour le récepteur AT_1 , liée à divers degrés de glycosylation. Par la technique d'hybridation *in situ*, nous avons localisé le gène AT_2 humain sur le chromosome X dans la région q22-q23 [10]. La séquence du récepteur AT_2 est faiblement analogue à celle du récepteur AT_1 , avec 30 % à 35 % de résidus identiques. Toutefois, les récepteurs AT_1 et AT_2 contiennent des séquences très conservées qui sont susceptibles

d'être impliquées dans la liaison du ligand. Parmi celles-ci, deux groupes de six acides aminés retrouvés dans les domaines transmembranaires tm2 (Thr-Leu-Pro-Leu-Trp-Ala), et tm5 (Lys-Asn-Ile-Leu-Gly-Phe) dans lequel on a montré que le résidu Lys était crucial à la liaison de l'Ang II au récepteur AT_1 [9]. D'autres résidus, tels le motif Asp-Arg-Tyr au début de la seconde boucle intracellulaire et le résidu Asp 74 dans le domaine tm2, essentiels au couplage du récepteur AT_1 aux protéines G et à la phospholipase C [11, 12], sont aussi retrouvés dans le récepteur AT_2 . Pourtant, en dépit de ces conservations, le mode

RÉFÉRENCES

14. Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Upregulation of cardiac angiotensin II AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ Res* 1995; 77: 11001-7.
15. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62: 749-56.
16. Giasson E, Meloche S. Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 5225-31.
17. Paquet JL, Baudoin-Legros M, Brunelle G, Meyer P. Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1990; 8: 565-72.
18. Meloche S, Servant MJ, Leduc I, Pellerin J. Angiotensin II stimulates protein synthesis but not DNA synthesis in rat fibroblasts expressing the human AT₁ receptor. *Biochem J* 1996 (sous presse).
19. Turla MB, Thompson MM, Corjay MH, Owens GK. Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1991; 68: 288-99.
20. Rao GN, Griendling KK, Frederickson RM, Sonenberg N, Alexander RW. Angiotensin II induces phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 7180-4.
21. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 1994; 371: 762-7.
22. Fleurent M, Gingras AC, 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* 1996 (sous presse).
23. Catt KJ, Sandberg K, Balla T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. In: Raizada MK, Phillips MI, Summers C, eds. *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993: 307-56.
24. Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-γ1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 10935-9.
25. Rainey WE, Byrd EW, Sinnokrot RA, Carr BR. Angiotensin-II activation of cAMP and corticosterone production in bovine adrenocortical cells: effects of nonpeptide angiotensin-II antagonists. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 81: 33-41.
26. Lassègue B, Alexander RW, Clark M. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 1993; 292: 509-17.

de transmission du signal du récepteur AT₂ semble atypique, différent de la majorité des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (*m/s n° 10, vol. 10, p. 1052*).

Récepteur AT₁ et hypertrophie cellulaire

De nombreuses études démontrent que l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II exerce un effet trophique à long terme sur plusieurs tissus ou types cellulaires, notamment sur le cœur et le muscle lisse vasculaire. Parmi les principaux résultats obtenus *in vivo*, citons: 1) l'inhibition de l'hypertrophie vasculaire chez les rats génétiquement hypertendus (SHR) traités par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou un antagoniste du récepteur AT₁; 2) le ralentissement de la croissance rapide du cœur chez le porc nouveau-né ou l'inhibition de l'hypertrophie du myo-

carde chez des rats avec surcharge volémique ou des rats SHR traités par des IEC ou un antagoniste AT₁; et 3) le développement d'une hypertrophie vasculaire et cardiaque chez les rats traités par l'Ang II [13]. En outre, la synthèse des récepteurs AT₁ cardiaques augmente au cours de l'hypertrophie cardiaque d'origine expérimentale ou génétique chez l'animal, suggérant un rôle du récepteur dans la genèse ou le maintien de la croissance exagérée de ce tissu [14]. *In vitro*, l'Ang II stimule la croissance de plusieurs types cellulaires, conduisant à une réponse hypertrophique (CMLV, myocytes cardiaques, cellules tubulaires proximales) ou hyperplasique (fibroblastes cardiaques) selon la cellule [2, 3]. Dans les CMLV isolées de rats normaux, l'Ang II stimule la synthèse de protéines et induit une hypertrophie cellulaire, sans modifier la synthèse d'ADN (*figure 2*) [15, 16]. En revanche, l'Ang II exerce un effet

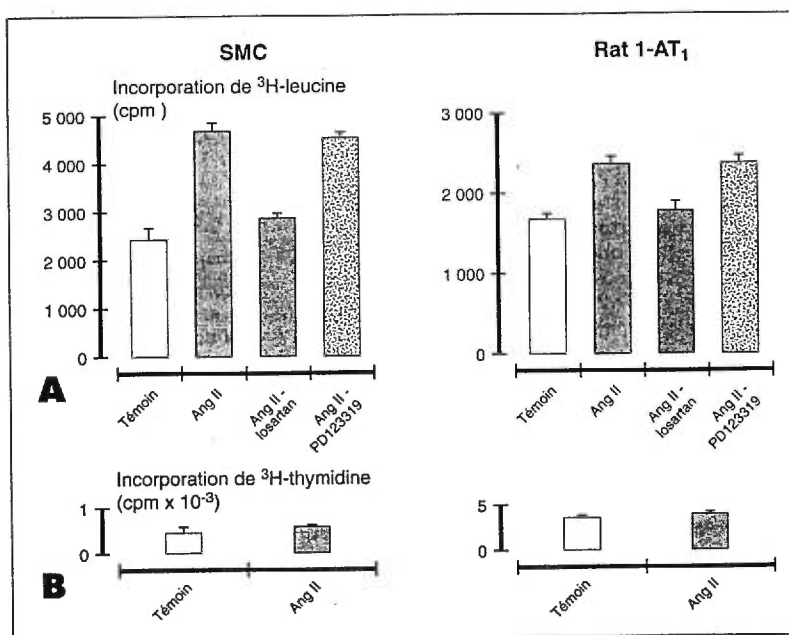


Figure 2. L'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II stimule la synthèse de protéines mais pas celle d'ADN. Des cellules musculaires lisses aortiques (SMC) de rat ou des fibroblastes de rat transfectés avec le gène humain du récepteur AT₁ (Rat1-AT₁), rendues quiescentes par incubation dans un milieu sans sérum, ont été stimulées pendant 24 heures avec de l'Ang II en absence ou en présence de losartan, l'antagoniste AT₁, ou de PD123319, l'antagoniste AT₂. (A) Vitesse de synthèse des protéines mesurée par incorporation de ³H-leucine. (B) Vitesse de synthèse d'ADN mesurée par incorporation de ³H-thymidine.

RÉFÉRENCES

27. Rao GN, Lassègue B, Alexander RW, Griendling KK. Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1994; 299: 197-201.
28. Jefferies HBJ, Reihnard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the polypyrimidine tract mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4441-5.
29. Tsuda T, Kawahara Y, Shii K, Koide M, Ishida Y, Yokoyama M. Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1991; 285: 44-8.
30. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 16047-52.
31. Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 7338-45.
32. Leduc I, Haddad P, Giasson E, Meloche S. Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 582-92.
33. Leduc I, Meloche S. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 4401-4.
34. Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM, Dy R. Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 28440-7.
35. Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II stimulates *sis*-inducing factor-like DNA binding activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 31443-9.
36. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* 1995; 375: 247-50.
37. Keiser JA, Panek RL. Pharmacology of AT₂ receptors. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin receptors*. New York: Plenum Press, 1994: 135-49.
38. Viswanathan M, Saavedra JM. Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides* 1992; 13: 783-6.
39. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁- and AT₂-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* 1994; 267: H844-52.
40. Stoll M, Steckelings M, Paul M, Botari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-7.

m/s n° 12, vol. 12, décembre 96

Voies de signalisation du récepteur AT₁

La liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ active de nombreuses voies de signalisation par l'intermédiaire d'au moins deux classes de protéines G (figure 3). Le mécanisme le mieux documenté est l'activation de la phospholipase C, qui donne lieu à la formation de deux seconds messagers : l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol [4, 23]. L'IP₃ se lie à des récepteurs-canaux calciques spécifiques pour induire la libération de Ca²⁺ à partir de réservoirs intracellulaires, tandis que le diacylglycérol active plusieurs isoformes de la protéine kinase C. La stimulation de la phospholipase C (isoforme β) est insensible à la toxine de *Bordetella pertussis* et est probablement relayée par la sous-unité α d'une protéine G de la famille Gq [18, 23]. Cependant, une étude récente montre que l'Ang II stimule la phosphorylation de résidus tyrosine de la phospholipase C-γ1 et suggère que cette dernière isoforme serait couplée au récepteur AT₁ [24]. Comme pour les autres hormones mobilisant le Ca²⁺, certains travaux suggèrent que l'Ang II stimule aussi l'influx de Ca²⁺ à travers des canaux calciques sensibles au potentiel et, possiblement, d'autres canaux activés par un récepteur [23]. Cependant, ces résultats demeurent controversés. Au niveau fonctionnel, de nombreux éléments plaident en faveur d'un rôle critique du Ca²⁺ et des isoformes de protéine kinase C dans l'action hypertrophique du récepteur AT₁. Par exemple, l'introduction d'une mutation ponctuelle dans le récepteur AT₁ qui découple le récepteur de la phospholipase C supprime totalement l'effet hypertrophique de l'Ang II (M. Servant, S. Meloche, résultats non publiés). Dans plusieurs tissus cibles, l'Ang II inhibe l'activité de l'adénylyl cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G_i sensible à la toxine de *Bordetella pertussis* [18, 23]. Cependant, la toxine n'interfère pas avec l'effet stimulant de l'Ang II sur la synthèse de protéines dans les CMLV et les cellules Rat1-AT₁, démontrant ainsi que les voies de signalisation dépendantes de G_i ne sont pas impliquées dans cette réponse [18]. Par ailleurs, il a aussi

été rapporté que la production d'AMP cyclique pouvait être augmentée dans certains tissus après activation du récepteur AT_1 [25]. L'Ang II active également la phospholipase D, qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et choline

[26]. L'acide phosphatidique est métabolisé de nouveau en diacylglycérol par une phosphohydrolase, prolongeant ainsi l'accumulation du second messager. Enfin, l'Ang II stimule la phospholipase A_2 et donc la production d'acide arachidonique

dans certains tissus [27]. Le rôle exact des phospholipases D et A_2 dans l'effet hypertrophique de l'Ang II reste à préciser. La conséquence immédiate de ces signaux précoces est l'activation d'un réseau complexe de protéine kinases

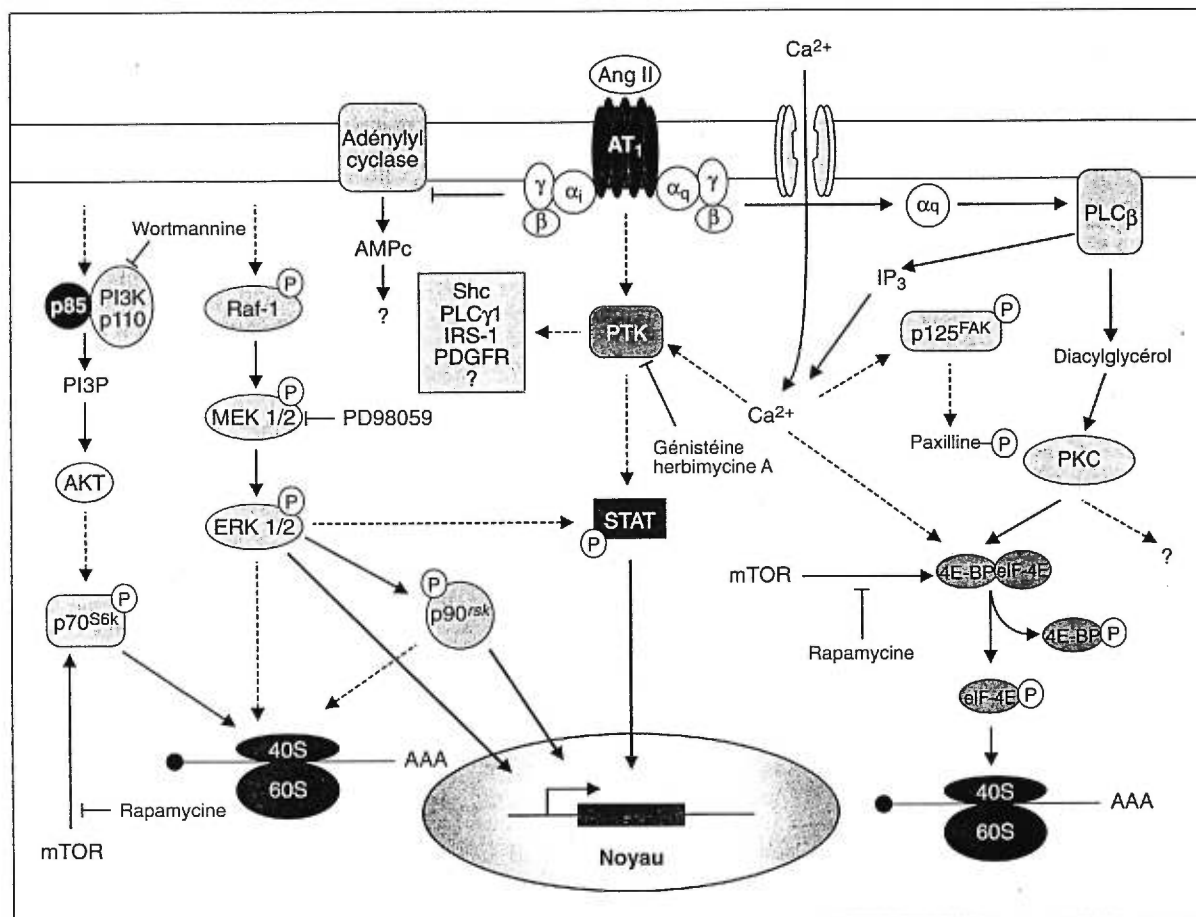


Figure 3. Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteur AT_1 . La liaison de l'Ang II au récepteur AT_1 active plusieurs effecteurs cellulaires par l'intermédiaire d'au moins deux classes de protéines G, soit G_q et $G_{12/13}$. De nombreux éléments suggèrent que l'activation de la PLC par G_q et la production qu'elle entraîne d' IP_3 et de diacylglycérol, joue un rôle critique dans l'action trophique de l'Ang II. En revanche, les voies de transmission du signal dépendantes de G_i ne semblent pas impliquées dans cette réponse. L'augmentation de la concentration intracellulaire des seconds messagers conduit à l'activation de plusieurs cascades de protéine kinases qui agissent de façon synergique pour augmenter la vitesse de synthèse globale des protéines. L'effet hypertrophique de l'Ang II se manifeste par des changements au niveau de la transcription des gènes et de la vitesse de traduction des ARN messagers. Les flèches en pointillé indiquent que le nombre et la nature des intermédiaires est inconnu. Les protéine kinases sont représentées en rose. Abréviations: Ang II, angiotensine II; PLC, phospholipase C; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; AKT, produit du proto-oncogène c-akt/protéine kinase B; $p70^{S6k}$, p70 S6 kinase; mTOR, target of rapamycin de mammifères; MEK, MAP kinase/ERK Kinase; ERK, Extracellular signal-Regulated Kinase; PTK, protéine tyrosine kinase; IRS-1, insuliner receptor substrate 1; PDGFR, récepteur du PDGF (platelet-derived growth factor); STAT, signal transducer and activator of transcription; FAK, focal adhesion kinase; IP_3 , inositol 1, 4, 5-trisphosphate; PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate; PKC, protéine kinase C; eIF, facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes; 4E-BP, 4E-binding protein. La wortmannine inhibe la PI3K; la rapamycine inhibe la $p70^{S6k}$ et mTOR. Les génistéine et herbimycine sont des inhibiteurs des tyrosine kinases.

qui vont intégrer et propager les signaux vers les compartiments cellulaires impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines. Nous avons montré que l'activation du récepteur AT₁ stimule la phosphorylation et l'activité enzymatique de la p70 S6 kinase dans les CMLV [16]. La phosphorylation de la protéine ribosomique S6 par la p70 S6 kinase est intimement corrélée à l'effet stimulant des facteurs de croissance sur la traduction, ce qui s'expliquerait en partie par le rôle de la S6 dans le recrutement vers les polysomes des ARN messagers possédant une séquence riche en pyrimidine à leur extrémité 5' [28]. Le traitement des CMLV par la rapamycine, un inhibiteur sélectif de la p70 S6 kinase, entraîne une réduction marquée de la synthèse de protéines induite par l'Ang II, suggérant un rôle important de cette protéine kinase dans la réponse hypertrophique [16]. Plusieurs équipes ont rapporté que l'Ang II stimule puissamment l'activité enzymatique des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases ERK1 et ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*) dans les CMLV et autres cellules cibles [16, 29]. En utilisant un inhibiteur sélectif de la voie enzymatique ERK1/ERK2, le composé synthétique PD98059, nous avons démontré que l'activation de cette voie est nécessaire à l'action stimulante des facteurs de croissance comme l'Ang II sur la synthèse de protéines dans les CMLV [30]. Cependant, le site d'action des isoformes de MAP kinase dans le contrôle de la synthèse des protéines n'est pas connu. Bien que le rôle de ces enzymes dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes soit bien documenté, leur implication au niveau de la traduction demeure hypothétique. Fait intéressant, outre sa propriété de stimuler l'activité de protéine sérine/thréonine kinases, l'Ang II augmente également la phosphorylation des résidus tyrosine de plusieurs protéines suite à sa liaison au récepteur AT₁ [31, 32]. Nous avons identifié le substrat majeur comme étant la paxilline, une protéine de 68 kDa associée aux plaques d'adhérence focales de la cellule [33]. Parmi les autres protéines dont le niveau de phosphorylation des résidus tyrosine est augmenté par un

traitement par l'Ang II, on retrouve : p125^{FAK} (*focal adhesion kinase*), phospholipase C- γ 1, Shc, ERK1/ERK2, IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) et le récepteur du PDGF (*platelet-derived growth factor*). Il est intéressant de noter que ces protéines sont généralement phosphorylées en réponse à l'activation de récepteurs tyrosine kinases, suggérant ainsi l'existence d'effecteurs communs entre le récepteur AT₁ et les récepteurs à activité tyrosine kinase. L'identité de la (des) tyrosine kinase(s) impliquée(s) demeure inconnue, mais des travaux récents suggèrent que l'Ang II active au moins deux tyrosine kinases, la p125^{FAK} et une nouvelle tyrosine kinase cytosolique dépendante du Ca²⁺ [34]. Afin de définir le rôle de la phosphorylation sur des résidus tyrosine dans l'action hypertrophique de l'Ang II, nous avons traité des CMLV par la génistéine et l'herbimycine A, deux inhibiteurs sélectifs des tyrosine kinases. Les résultats de ces expériences ont clairement démontré que l'inhibition de la phosphorylation sur des résidus tyrosine abolit complètement l'induction de la synthèse de protéines par l'Ang II dans ces cellules [32]. En revanche, les inhibiteurs des tyrosine kinases n'interfèrent pas avec la stimulation de la phospholipase C, ou l'activation des MAP kinases ERK1/ERK2 et de la p70 S6 kinase. L'ensemble de ces résultats suggère que de multiples cascades de protéine kinases agissent de façon synergique pour contrôler la vitesse globale de synthèse de protéines.

Finalement, comme tous les facteurs de croissance, l'Ang II stimule l'induction des gènes de réponse précoces comme *c-fos*, *fosB*, *c-jun*, *egr-1* et *c-myc*, qui codent pour des facteurs de transcription [3, 18]. Le rôle de ces facteurs dans la réponse hypertrophique demeure spéculatif, mais il est probable qu'ils contrôlent la transcription de certains gènes de protéines de structure. Des travaux récents ont également montré que l'Ang II stimulait une activité de liaison à l'ADN de type SIF (*sis-inducing factor*) et augmentait la phosphorylation sur des résidus tyrosine du facteur de transcription STAT1 [35, 36]. Ces résultats font clairement apparaître des similitudes dans le mode d'action du récepteur AT₁ et dans

celui des récepteurs des cytokines et des récepteurs à activité de tyrosine kinase.

Récepteur AT₂ et croissance cellulaire

Des données récentes obtenues *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le récepteur AT₂ pourrait jouer un rôle important dans les processus physiologiques et pathologiques de croissance rapide des tissus. Chez le rat, le récepteur AT₂ est abondamment synthétisé dans les tissus mésenchymateux du fœtus, dans le cerveau et les glomérules rénaux en cours de maturation, ainsi que dans le cœur et l'aorte au cours des premières semaines après la naissance [37]. Sa synthèse est quasiment réprimée chez l'adulte, mais augmente à nouveau de manière significative lors du processus de cicatrisation cutanée [38], après désendothélialisation de la paroi vasculaire et dans le cœur, au cours de l'hypertrophie ventriculaire gauche induite par une sténose de l'aorte thoracique [39].

Dans les cellules endothéliales coronaires de rats SHR, qui synthétisent simultanément les deux sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂ dans les proportions respectives de 80 % et 20 %, la prolifération cellulaire induite par le FGF (*fibroblast growth factor*) est inhibée de manière dépendante de la dose par l'Ang II [40]. Cet effet antiprolifératif est aboli en présence du PD123177 et non du losartan, suggérant qu'il s'exerce par l'intermédiaire des récepteurs AT₂. Cette hypothèse est renforcée par des expériences montrant que des cellules endothéliales coronaires quiescentes traitées par l'Ang II peuvent proliférer à condition que les récepteurs AT₁ soient actifs et les récepteurs AT₂ bloqués [40]. L'action antagoniste du récepteur AT₂ sur la prolifération cellulaire a également été observée dans des CMLV après transfection du gène du récepteur AT₂ (*m/s n° 2, vol. 12, p. 264*) [41]. Enfin, des résultats préliminaires montrent que les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés, qui synthétisent les deux types de récepteurs, développent une hypertrophie significativement plus importante en présence qu'en absence de PD123177 lorsqu'ils sont traités par l'Ang II pendant 72 heures [42]. Il est intéressant

RÉFÉRENCES

41. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, *et al.* The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10663-7.
42. Booz GW, Reiprith MJ, Baker KM. AT₂ receptor blockade augments angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 1995; 26: 547.
43. Janiak P, Pillon A, Prost JF, Vilaine JP. Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension* 1992; 20: 737-45.
44. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 156-60.
45. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature* 1995; 377: 744-7.
46. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, *et al.* Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995; 377: 748-50.
47. Tsutsumi K, Saavedra JM. Heterogeneity of angiotensin II AT₂ receptors in the rat brain. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 290-7.
48. Kang J, Posner P, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 1994; 267: C1389-97.
49. Buisson B, Laflamme L, Bottari SP, de Gasparo M, Gallo-Payet N, Payet MD. A G protein is involved in the angiotensin AT₂ receptor inhibition of the T-Type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 1670-4.
50. Siemens IR, Reagan LP, Yee DK, Fluhrhart SJ. Biochemical characterization of two distinct angiotensin AT₂ receptor populations in murine neuroblastoma N1E-115 cells. *J Neurochem* 1994; 62: 2106-15.
51. Dudley DT, Hubbel SE, Summerfelt RM. Characterization of angiotensin II (AT₂) binding sites in R3T3 cells. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 360-7.
52. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 4832-8.
53. Nahmias C, Cazaubon SM, Briend-Sutren MM, Lazard D, Villageois P, Strosberg AD. Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem J* 1995; 306: 87-92.
54. Sun H, Tonks NK, Bar-Sagi D. Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science* 1994; 266: 285-8.

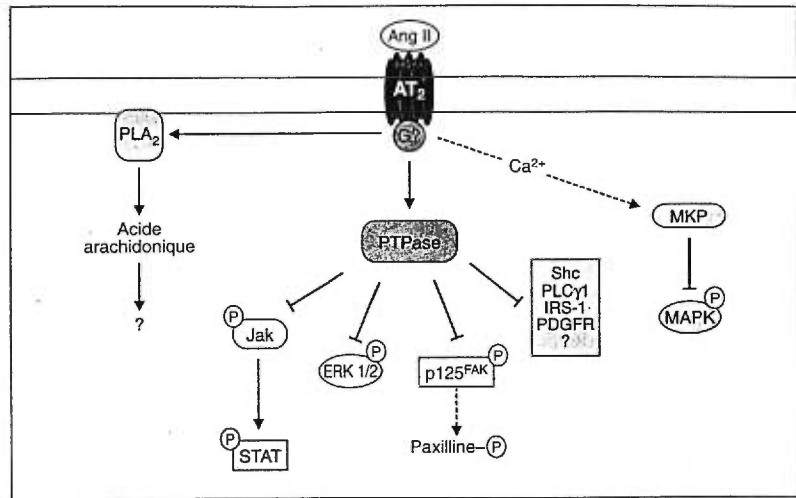


Figure 4. Voies présumées de transmission du signal relayé par le récepteur AT₂ dans le contrôle de la croissance cellulaire. La liaison de l'Ang II au récepteur AT₂ pourrait stimuler l'activité d'une protéine tyrosine phosphatase et entraîner la déphosphorylation et l'inactivation de protéines et/ou d'effecteurs essentiels pour la synthèse d'ADN et de protéines. Nous avons également démontré que l'activation du récepteur AT₂ pouvait induire la synthèse de la protéine phosphatase à double spécificité MKP-1, une enzyme capable d'inactiver divers membres de la famille des MAP kinases. Finalement, l'activation du récepteur AT₂ provoque la libération d'acide arachidonique dans certains types cellulaires. Abréviations: PTPase, protéine tyrosine phosphatase; Jak, Janus kinase; MKP, MAP kinase phosphatase; MAPK, MAP kinase; PLA₂, phospholipase A₂.

de noter que l'effet anti-croissance relayé par le sous-type AT₂ se traduit de différentes manières selon le type de cellule: action antimittotique sur des cellules encore capables de se diviser, action antihypertrophique sur des cellules ayant perdu cette capacité, comme les myocytes cardiaques en phase terminale de différenciation. Certaines observations faites *in vivo* confortent aussi l'hypothèse d'une action anti-croissance du récepteur AT₂. Ainsi, chez le rat, l'hypertrophie intinale consécutive à une désendothélialisation de la carotide est inhibée en présence de l'agoniste AT₂ CGP 42112A [43] et réduite de 70 % lorsque le récepteur AT₂ est produit localement de manière anormalement élevée après transfert *in vivo* du gène [41]. Donc, l'activation des récepteurs AT₂ pourrait exercer un effet de frein sur certains processus de croissance cellulaire rapide, contribuant ainsi à la régulation de l'homéostasie tissulaire. Des études réalisées sur les lignées cellulaires R3T3 et PC12W, ainsi que sur des cel-

lules de la granulosa ovarienne, suggèrent que l'effet antiprolifératif du récepteur AT₂ s'exercerait en partie par une induction de l'apoptose [44]. A ce stade, il est possible de formuler l'hypothèse selon laquelle le modelage des tissus au cours du développement fœtal (organogenèse) et le remodelage tissulaire se produisant chez l'adulte lors de processus tumoraux, cicatriciels, ou au cours de l'hypertension artérielle sont en partie dépendants de l'Ang II, l'équilibre entre croissance, différenciation et apoptose cellulaire étant contrôlé par la prédominance de l'un ou l'autre des deux sous-types de récepteurs. Toutefois, l'hypothèse de la transmission par le récepteur AT₂ d'une action antiproliférative ou apoptotique de l'Ang II dans les situations de croissance rapide est en apparence contradiction avec la description récente de souris transgéniques nulles au locus du gène AT₂ (*m/s n° 1*, vol. 12, p. 122) [45, 46]. En effet, ces auteurs ont montré que l'inactivation du gène AT₂ n'induit ni dysfonction-

nement ni modification tissulaire au cours du développement embryonnaire. Les seules modifications décrites chez ces souris sont une diminution générale de l'activité motrice et une sensibilité accrue à l'effet vasopresseur de l'Ang II.

La principale question qui se pose maintenant est la suivante : par quel mécanisme la stimulation des récepteurs AT₂ interfère-t-elle avec la croissance cellulaire ? Pour y répondre, plusieurs groupes tentent d'identifier les voies de signalisation du récepteur AT₂. Puisque le récepteur AT₂ présente une structure à sept domaines transmembranaires, il est apparu logique de vérifier son couplage aux protéines G. Bien qu'apparemment simple, cette question reste encore sans réponse définitive. En effet, des études pharmacologiques utilisant des analogues du GTP ou la toxine de *Bordetella pertussis* ont montré que la sensibilité du récepteur AT₂ à ces agents varie selon le type tissulaire et/ou cellulaire. Dans la quasi-totalité des tissus fœtaux et neuronaux, et dans certains types de cellules, utérines, ovariennes, médullo-surrénales, PC12W et fibroblastes R3T3, le récepteur AT₂ n'apparaît pas associé à une protéine G [6]. En revanche, des sites AT₂ synthétisés dans certaines zones spécifiques du cerveau présentent des caractéristiques pharmacologiques typiques des récepteurs couplés aux protéines G [47]. De même, dans des cultures primaires de neurones de rats nouveau-nés, l'augmentation des courants potassiques intracellulaires induite par l'activation du récepteur AT₂ fait intervenir une protéine G sensible à la toxine de *pertussis* [48]. Dans les cellules de la lignée NG108-15, la diminution des courants calciques relayée par le récepteur AT₂ dépendrait aussi d'une protéine G encore non identifiée [49]. Ces résultats controversés pourraient s'expliquer par l'existence possible de deux isoformes du récepteur AT₂ chez les rongeurs, l'une couplée aux protéines G et l'autre non [47, 50]. L'identité des effecteurs et second messagers impliqués dans l'action

régulatrice du récepteur AT₂ sur la croissance reste à déterminer. Dans les fibroblastes R3T3 et les cellules PC12W, la liaison de l'Ang II au récepteur AT₂ n'exerce aucun effet sur la production d'AMP cyclique, de GMP cyclique, d'inositol phosphates, d'acide arachidonique et de prostacycline, ni sur la mobilisation de Ca²⁺ intracellulaire [51]. En revanche, dans les myocytes cardiaques, l'activation du récepteur AT₂ stimule la libération d'acide arachidonique, probablement par l'intermédiaire de la phospholipase A₂ [52]. De même, l'activation du récepteur AT₂ entraîne des modifications des courants ioniques [48, 49] et une diminution de la concentration intracellulaire de GMP cyclique dans les cellules neuronales et PC12W [7]. Cependant, le lien existant entre ces événements biochimiques et la croissance cellulaire demeure obscur. D'autre part, une étude récente montre que l'activation du récepteur AT₂ provoque une diminution rapide et transitoire de la phosphorylation de résidus tyrosine de plusieurs protéines dans les cellules NIE-115 [53]. Sachant le rôle crucial de la phosphorylation de résidus tyrosine dans le contrôle de la croissance cellulaire, ces résultats suggèrent que l'action du récepteur AT₂ pourrait être relayée par une protéine tyrosine phosphatase. Une telle hypothèse a également été proposée pour expliquer les actions antiprolifératives de la dopamine et la somatostatine, également relayées par un récepteur à sept domaines transmembranaires. Dans ce contexte, nous avons récemment montré dans une lignée de fibroblastes de rat produisant de façon stable le récepteur AT₂ humain (Rat1-AT₂), qu'une stimulation par l'Ang II induit la synthèse de la protéine phosphatase MKP-1 après 30 et 60 minutes de traitement (C. Chasagne, S. Meloche, résultats non publiés). Cette protéine phosphatase, qui est codée par un gène de réponse précoce, bloque la synthèse d'ADN lorsque son gène est transfecté ou qu'elle est micro-injectée dans les cellules [54]. Des travaux sont actuelle-

ment en cours afin de définir les mécanismes d'induction du gène *MKP-1* et d'identifier les cibles de cette protéine phosphatase.

Perspectives

La découverte de l'existence de sous-types de récepteurs de l'Ang II et le développement d'antagonistes sélectifs de ces récepteurs ont permis de mieux caractériser les multiples actions de l'Ang II et ouvert de nouvelles perspectives pharmacologiques pour le traitement des maladies cardio-vasculaires. Ainsi, les expériences effectuées *in vitro* et *in vivo* ont clairement démontré que l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II augmente la synthèse globale de protéines et induit une hypertrophie cellulaire dans les CMLV et les myocytes cardiaques. D'autre part, des travaux récents suggèrent que le sous-type AT₂ pourrait exercer un effet anti-croissance au niveau cellulaire (anti-prolifératif, anti-hypertrophique ou apoptotique selon le type cellulaire), s'opposant ainsi à l'action trophique relayée par le récepteur AT₁ ou à l'effet mitogénique d'autres facteurs de croissance. La caractérisation du rôle respectif des récepteurs AT₁ et AT₂ dans le contrôle de la croissance cellulaire s'avère d'une importance considérable du point de vue pharmacothérapeutique, puisque l'administration de losartan (antagoniste AT₁) entraîne une augmentation des concentrations circulantes d'Ang II chez l'homme. Ainsi, si le récepteur AT₂ interfère réellement avec la croissance cellulaire, les bloqueurs AT₁ pourraient présenter un avantage pharmacologique en exerçant un double effet bénéfique sur la prévention de l'hypertrophie vasculaire et cardiaque.

TIRÉS À PART

S. Meloche.

**Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase
phosphatase-1 expression**

Essential role of calcium in the regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression

Jean-Claude Scimeca, Marc J Servant, Joseph-Omer Dyer and Sylvain Meloche

Centre de Recherche, Hôtel-Dieu de Montréal and Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1T8

Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 (MKP-1) is a dual-specificity protein phosphatase encoded by an immediate-early gene responsive to growth factors and stress. The MKP-1 protein selectively inactivates MAP kinases *in vitro* by dephosphorylation of the regulatory Thr and Tyr residues. Little is known on the mechanisms that regulate *MKP-1* gene expression. Here, we demonstrate that Ca^{2+} is both necessary and sufficient for the induction of *MKP-1* gene expression. Treatment of Rat1 fibroblasts with the Ca^{2+} chelating agent BAPTA completely suppressed serum-induced MKP-1 expression in a dose- and time-dependent manner. The inhibitory effect of BAPTA was observed at the level of the protein and the mRNA. Importantly, Ca^{2+} chelation blocked the induction of MKP-1 expression in response to all stimuli tested and in different cell types. Increasing the intracellular concentration of Ca^{2+} with the ionophore A23187 was sufficient to induce MKP-1 mRNA and protein expression in rat fibroblasts. We also provide evidence that activation of MAP kinases is not an absolute requirement for induction of the *MKP-1* gene. Exposure of rat fibroblasts to A23187 induced MKP-1 expression without activating the JNK and p38 MAP kinase pathways. Also, inhibition of the ERK pathway with the selective MEK inhibitor PD98059 did not interfere with serum-stimulated *MKP-1* mRNA expression. These results will help define the regulatory mechanisms that govern *MKP-1* gene transcription in target cells.

Keywords: phosphatase; MAP kinase; gene expression; calcium

Introduction

Mitogen-activated protein (MAP) kinases are a family of proline-directed serine/threonine kinases which play a key role in transducing signals from a wide range of extracellular stimuli into intracellular responses. Three distinct subfamilies of MAP kinases are currently known in vertebrates: the extracellular signal-regulated kinases (ERKs), the stress-activated protein (SAP)/Jun N-terminal kinases (JNKs), and p38 (reviewed in (Davis, 1994; Cano and Mahadevan, 1995; Cobb and Goldsmith, 1995)). The ERK isoforms ERK1/ERK2 are activated in response to mitogenic and differentiation factors (Cobb *et al.*, 1991; L'Allemain, 1994), whereas JNKs and p38 respond mainly to environ-

mental stress and proinflammatory cytokines (Kyriakis *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994; Raingeaud *et al.*, 1995; Force *et al.*, 1996). The activation of MAP kinases is mediated by a family of dual-specificity enzymes, called MAP kinase kinases, which phosphorylate the proteins on both threonine and tyrosine residues within the sequence T-X-Y (Cobb and Goldsmith, 1995; Waskiewicz and Cooper, 1995). On the other hand, much less is known on the mechanisms leading to inactivation of MAP kinases.

Recently, a novel family of dual-specificity protein phosphatases capable of dephosphorylating the regulatory threonine and tyrosine residues of MAP kinases has been described (reviewed in Keyse, 1995). All these enzymes bear the characteristic active-site motif of protein tyrosine phosphatases (PTPs) and display sequence homology to the vaccinia virus VH1 phosphatase (Guan *et al.*, 1991). The first mammalian gene of this family to be discovered was mouse *3CH134* (also known as *erp*) and its human homologue *CL100* (also known as *hVH-1*) which was isolated as an immediate-early gene inducible by growth factors and stress (Charles *et al.*, 1992; Keyse and Emslie, 1992; Noguchi *et al.*, 1993; Zheng and Guan, 1993). Recombinant 3CH134/CL100 purified from bacteria preferentially dephosphorylates the phosphothreonine and phosphotyrosine residues of MAP kinases *in vitro* resulting in their inactivation (Charles *et al.*, 1993; Alessi *et al.*, 1993; Zheng and Guan, 1993). Overexpression of 3CH134 in COS cells leads to dephosphorylation and inactivation of ERK1/ERK2; and catalytically-inactive 3CH134 physically associates with the phosphorylated form of ERK1/ERK2 in intact cells (Sun *et al.*, 1993). On the basis of these results, the 3CH134/CL100 phosphatase was renamed MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). The expression of MKP-1 was further shown to inhibit ERK-dependent reporter gene activity (Sun *et al.*, 1994b; Brondello *et al.*, 1995), to block cell cycle progression and entry into S phase of fibroblast cells (Noguchi *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1994b; Brondello *et al.*, 1995) and to prevent PC12 cell differentiation (Fukuda *et al.*, 1995). All these observations suggest that MKP-1 might be a physiological MAP kinase phosphatase, but its relative contribution to the inactivation of MAP kinases in specific cellular processes *in vivo* remains to be established.

Other members of the VH1 family of dual-specificity protein phosphatases include VHR (Ishibashi *et al.*, 1992), PAC-1 (Rohan *et al.*, 1993), MKP-2/hVH-2/TYP-1 (Guan and Butch, 1995; Misra-Press *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995), B23/hVH-3 (Ishibashi *et al.*, 1994; Kwak *et al.*, 1995), hVH-5 (Martell *et al.*, 1995) and rVH-6/MKP-3 (Mourey *et al.*, 1996; Muda *et al.*,

1996). These gene products have unique but overlapping tissue distribution patterns. Like MKP-1, all the enzymes exhibit activity towards phosphorylated ERK1/ERK2 *in vitro*. Moreover, *in vivo* expression of PAC-1, MKP-2, and MKP-3 interferes with growth factor-dependent phosphorylation and enzymatic activation of ERK1/ERK2 (Ward *et al.*, 1994; King *et al.*, 1995; Muda *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1996). Interestingly, recent results obtained in transient transfection experiments suggest that individual MAP kinase phosphatases may have distinct specificities for the ERK, JNK and p38 MAP kinases (Chu *et al.*, 1996).

Little is known on the mechanisms by which growth factors and stress activate transcription of the gene encoding MKP-1. The induction of *MKP-1* mRNA expression has been observed in several cell types in response to stimuli as diverse as growth and differentiation factors, cAMP-elevating agents, phorbol esters, heat shock, oxidative stress, and genotoxic agents (Charles *et al.*, 1992; Keyse and Emslie, 1992; Noguchi *et al.*, 1993; Duff *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). The aim of this study was to characterize the signalling pathways involved in the regulation of MKP-1 expression. We demonstrate that calcium is both necessary and sufficient for *MKP-1* gene expression in fibroblast and smooth muscle cells. Moreover, we provide strong evidence that the three MAP kinases, ERKs, JNKs and p38, are not obligatory components of the pathways leading to transcription of the *MKP-1* gene in fibroblast cells.

Results

Calcium is necessary for induction of MKP-1 gene expression

To determine whether MKP-1 expression is controlled by reversible protein phosphorylation, we first examined the effect of two non selective protein kinase inhibitors, 2-aminopurine and K-252a (Mahadevan *et al.*, 1990; Kase *et al.*, 1987), on serum-induced expression of MKP-1. Growth-arrested Rat1 fibroblasts were pre-treated for 30 min with increasing concentrations of 2-aminopurine or K-252a and then stimulated for 90 min with 10% calf serum. Cell lysates were prepared and the expression of MKP-1 was analysed by immunoblotting using a specific antibody. Both inhibitors significantly reduced MKP-1 protein expression in a dose-dependent manner (Figure 1). K-252a was more potent than 2-aminopurine with a maximal inhibitory effect observed at 30 nM. In a complementary experiment, we also found that phloretin, an uncoupler and inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation which depletes cellular stores of ATP (De Jonge *et al.*, 1983), completely abolished the serum-dependent expression of MKP-1 in Rat1 cells (data not shown). These results strongly implicate the action of protein kinase(s) in the regulation of MKP-1 expression.

To gain insights into the nature of the protein kinase(s) involved, we evaluated the effect of selective inhibitors of protein kinase C (PKC) isoforms, tyrosine kinase inhibitors and a membrane-permeable Ca^{2+} chelating agent on serum-induced expression of MKP-1. CGP41251 is a compound which inhibits

Ca^{2+} -dependent and independent isoforms of PKC (Meyer *et al.*, 1989; Marte *et al.*, 1994), while Go6976 is more selective for the classical Ca^{2+} -dependent PKC isoforms (Martiny-Baron *et al.*, 1993). As shown in Figure 2a, the two PKC inhibitors, and the biologically inactive analog CGP42700, had no effect on the phosphatase expression level. Similarly, genistein and herbimycin A, two broad spectrum tyrosine kinase inhibitors (Akiyama *et al.*, 1987; Uehara *et al.*, 1989), did not modify the effect of serum on MKP-1 expression (Figure 2b). In contrast, treatment of Rat1 cells with the Ca^{2+} chelating agent BAPTA resulted in

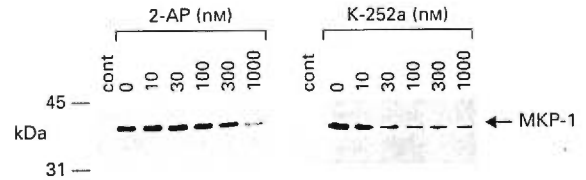


Figure 1 Inhibition of serum-induced MKP-1 expression by non selective protein kinase inhibitors. Quiescent Rat1 fibroblasts were pre-treated for 30 min with the indicated concentrations of 2-aminopurine (2-AP) or K-252a. The cells were then stimulated or not (cont) with 10% calf serum for 90 min. Equal amounts of lysate proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-MKP-1 antibody and the proteins visualized by chemiluminescence detection. The position of MKP-1 is indicated by an arrow

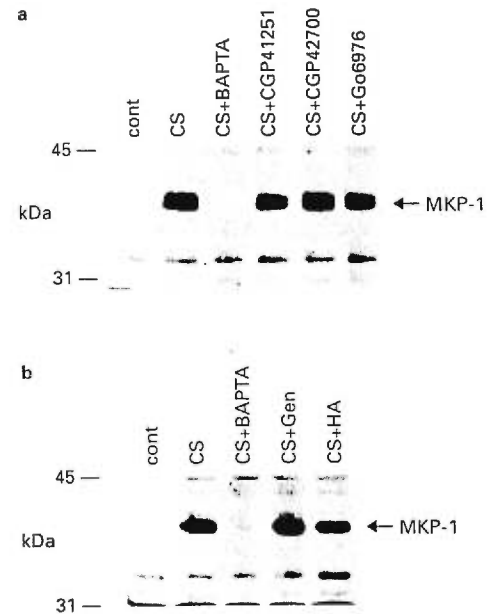


Figure 2 Effect of signalling inhibitors on serum-induced MKP-1 expression in Rat1 fibroblasts. Quiescent Rat1 fibroblasts were pre-treated for 30 min with the indicated signalling inhibitors, with the exception of herbimycin A which was present during 20 h. The cells were then stimulated or not (cont) with 10% calf serum (CS) for 90 min. The expression of MKP-1 protein was analysed by immunoblotting as described in Figure 1. The concentrations of drug inhibitors were: 10 μ M BAPTA, 10 μ M CGP41251, 10 μ M CGP42700, 10 μ M Go6976, 30 μ M genistein (Gen) and 0.5 μ M herbimycin A (HA)

a complete inhibition of the serum-dependent expression of MKP-1.

These results prompted us to investigate the effect of BAPTA in more detail. Pharmacological studies revealed that BAPTA inhibits MKP-1 expression in a dose-dependent manner with a half-maximal inhibition observed at a concentration of approximately 1 μM (Figure 3a). A complete inhibition was observed at 10 μM BAPTA. Time-course experiments indicated that addition of BAPTA 60 or 30 min before serum induced a total inhibition of MKP-1 expression (Figure 3b). When the chelating agent was added together with serum, only a partial inhibition was observed. The inhibitory effect was further reduced when BAPTA was added 30 min after serum stimulation, and completely disappeared at 60 min. BAPTA also reduced the rate of protein synthesis at this concentration, which may partly account for the effect seen on MKP-1 protein levels (data not shown). In order to determine if the involvement of Ca^{2+} was specific to the stimulus and/or the cellular context, we examined the effect of BAPTA on two different cell types, Rat1 fibroblasts and rat aortic smooth muscle cells (SMC), treated with various extracellular stimuli. As shown in Figure 4a, MKP-1 protein expression was strongly induced by serum in Rat1 fibroblasts, but also in response to epidermal growth factor, thrombin, phorbol esters, and heat shock. Pre-incubation of the cells with BAPTA completely abolished MKP-1 expression, whatever the stimulus used. The same experiment was performed in rat aortic SMC using the same stimuli, except for thrombin which was substituted by angiotensin II. As observed for Rat1 cells, MKP-1 expression was induced by all treatments and the response was blocked by BAPTA (Figure 4b).

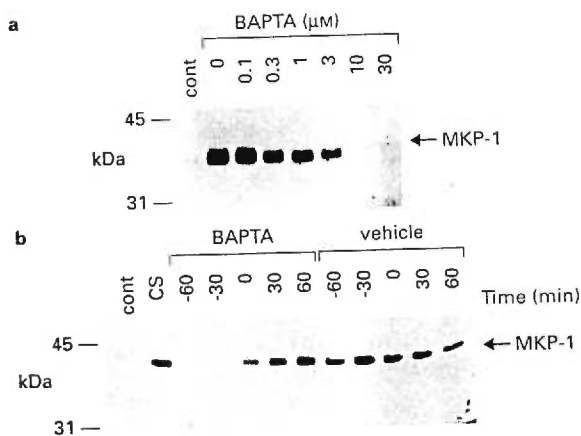


Figure 3 The inhibition of MKP-1 expression by BAPTA is dose- and time-dependent. (a) Quiescent Rat1 fibroblasts were pre-treated for 30 min with different concentrations of BAPTA prior to stimulation with medium (cont) or 10% calf serum for 90 min. (b) BAPTA (10 μM) or vehicle was added at various times before and after the addition of 10% calf serum to quiescent Rat1 cells. Time 0 corresponds to the beginning of the 90 min incubation period with serum. The cells were treated with medium (cont) or 10% calf serum (CS) for 90 min as control. The expression of MKP-1 protein was analysed by immunoblotting as described in Figure 1

Since MKP-1 is encoded by an immediate-early gene, it was of interest to determine if the effect of BAPTA is exerted at the transcriptional level. Rat1 fibroblasts were pretreated in the absence or presence of BAPTA before serum stimulation and the level of *MKP-1* mRNA was analysed by Northern blotting. As expected, serum rapidly and strongly increased the expression of *MKP-1* mRNA, which reached a maximal level at 30 min and declined thereafter (Figure 5). In the presence of BAPTA, the induction of *MKP-1* mRNA expression was almost completely abolished.

Increased calcium concentration is sufficient to induce MKP-1 gene expression

Together, the preceding results indicated that Ca^{2+} is required for MKP-1 gene expression. We then wanted to determine if an increase in the intracellular concentration of Ca^{2+} alone was sufficient to activate the *MKP-1* gene. Rat1 fibroblasts were treated with the Ca^{2+} ionophore A23187 and the level of MKP-1 expression was monitored as above. As shown in Figure 6a, addition of A23187 increased the expression of MKP-1 protein in a dose-dependent manner with a maximal effect observed at 3 μM . Time-course experiments revealed that A23187-induced MKP-1 expression reaches a maximum at approximately 2 h and slowly declines thereafter (Figure 6b). The effect of A23187 was most likely exerted at the level of gene transcription since the ionophore induced a strong and transient accumulation of *MKP-1* mRNA (eightfold stimulation over basal level) in these cells (Figure 6c). It is interesting to note that the kinetics of MKP-1 induction is slightly slower and the extent of MKP-1 expression is lower in cells treated with A23187 as

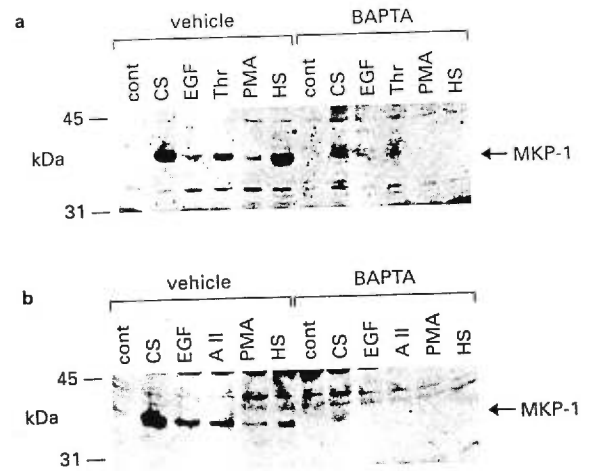


Figure 4 Effect of BAPTA on the induction of MKP-1 expression by various stimuli. Quiescent Rat1 cells (a) or rat aortic SMC (b) were pre-treated for 30 min in the absence (vehicle) or presence of 10 μM BAPTA. The cells were then exposed to the following stimuli: medium (cont), 10% calf serum (CS) for 90 min, 100 ng/ml epidermal growth factor (EGF) for 90 min, 3 U/ml thrombin (Thr) for 90 min, 100 nM PMA for 90 min, 100 nM angiotensin II (AII) for 90 min and heat shock at 42°C for 30 min followed by 60 min at 37°C (HS). The expression of MKP-1 protein was analysed by immunoblotting as described in Figure 1

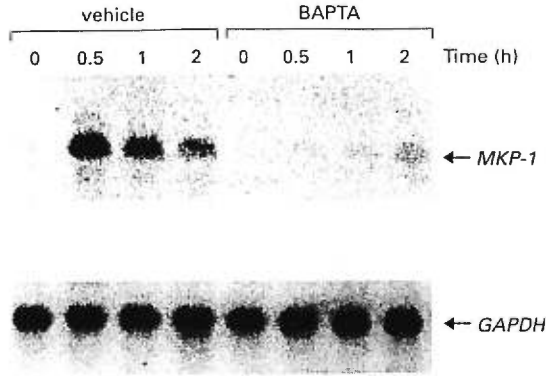


Figure 5 Inhibition of *MKP-1* mRNA expression by BAPTA in Rat1 fibroblasts. Quiescent Rat1 cells were pre-treated for 30 min with vehicle or with 10 μ M BAPTA. The cells were then stimulated for the indicated times with 10% calf serum. Total RNA was extracted from the cells and analysed by Northern hybridization using a 32 P-labeled *MKP-1* probe. The results were normalized by rehybridization of the blot with a *GAPDH* probe. The extent of hybridization was visualized by phosphorimaging analysis

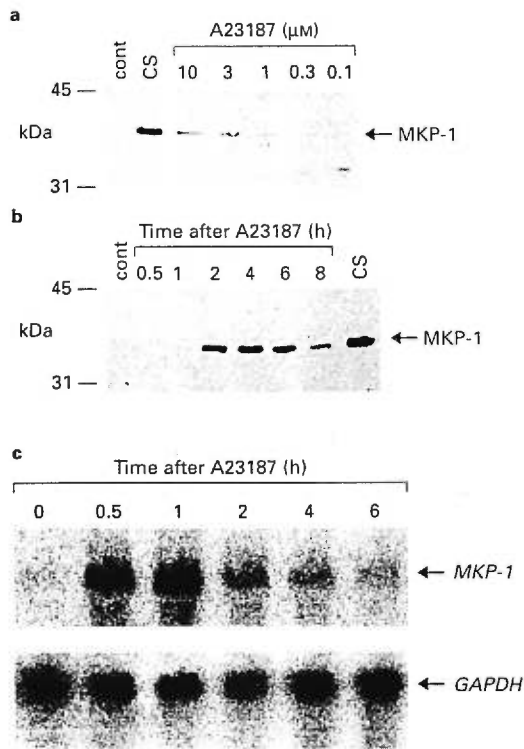


Figure 6 The Ca^{2+} ionophore A23187 induces *MKP-1* gene expression in Rat1 fibroblasts. Quiescent Rat1 fibroblasts were treated with different concentrations of A23187 for 4 h (a) or with 3 μ M A23187 for different period of times (b). The expression of MKP-1 protein was analysed by immunoblotting as described in Figure 1. The cells were stimulated with medium (cont) or with 10% calf serum (CS) for 90 min as control. (c) Quiescent Rat1 cells were stimulated with 3 μ M A23187 for the indicated times. Total RNA was extracted from the cells and analysed by Northern hybridization using a 32 P-labeled *MKP-1* probe. Results were normalized by rehybridization of the membrane with a *GAPDH* probe

compared to serum. This suggests that additional signalling pathways might be required for full transcriptional activation of the *MKP-1* gene.

Induction of MKP-1 gene expression in the absence of MAP kinases activation

We also performed a series of experiments to investigate if MAP kinases, which are putative substrates of the phosphatase, are required for the induction of MKP-1 expression in response to extracellular signals. Indeed, it has been recently proposed that activation of the JNK pathway induces *MKP-1* gene transcription in NIH3T3 cells (Bokemeyer et al., 1996). We first measured the enzymatic activity of JNK2, ERK1, and p38 in Rat1 cells following stimulation with A23187. Ca^{2+} influx caused a strong activation of ERK1, which reached a maximum at approximately 15 min (eightfold stimulation) and remained elevated for at least 2 h (Figure 7b). In contrast, addition of A23187 did not activate JNK2

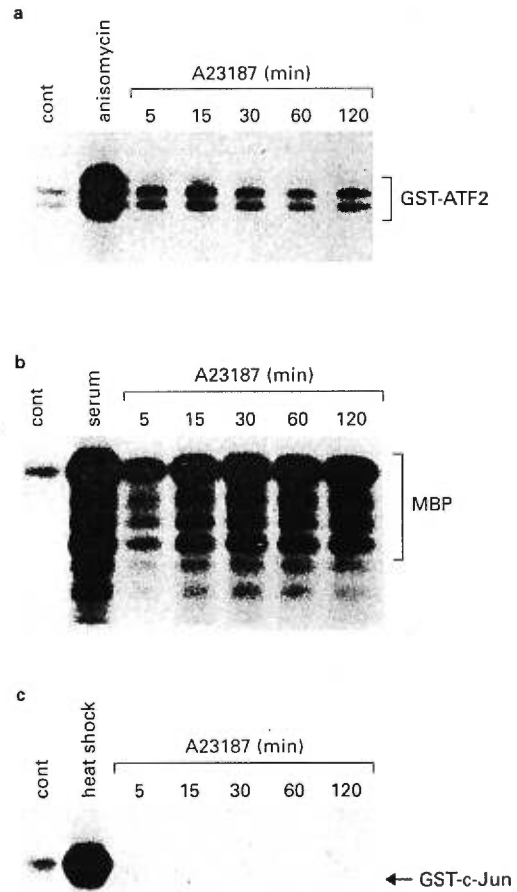


Figure 7 Effect of A23187 on JNK, ERK and p38 MAP kinase pathways in Rat1 fibroblasts. Quiescent Rat1 cells were stimulated with 3 μ M A23187 for the indicated period of times. Cell lysates were prepared and p38 (upper panel), ERK1 (middle panel) or JNK2 (lower panel) were immunoprecipitated using specific antibodies preadsorbed to protein A-Sepharose beads. The phosphotransferase activity of each MAP kinase was assayed directly using GST-ATF2 (p38), MBP (ERK1), or GST-c-Jun (JNK2) as substrate (see Materials and methods)

and only had a weak (twofold) and transient stimulatory effect on p38 activity (Figure 7c and 7a). Exposure of the cells to heat shock or anisomycin confirmed that JNK2 and p38 are fully active. We next

used a pharmacological approach to address the role of the ERK pathway in the induction of *MKP-1* gene expression. PD98059 is a synthetic drug inhibitor which selectively inhibits the activity of ERK1/ERK2 by

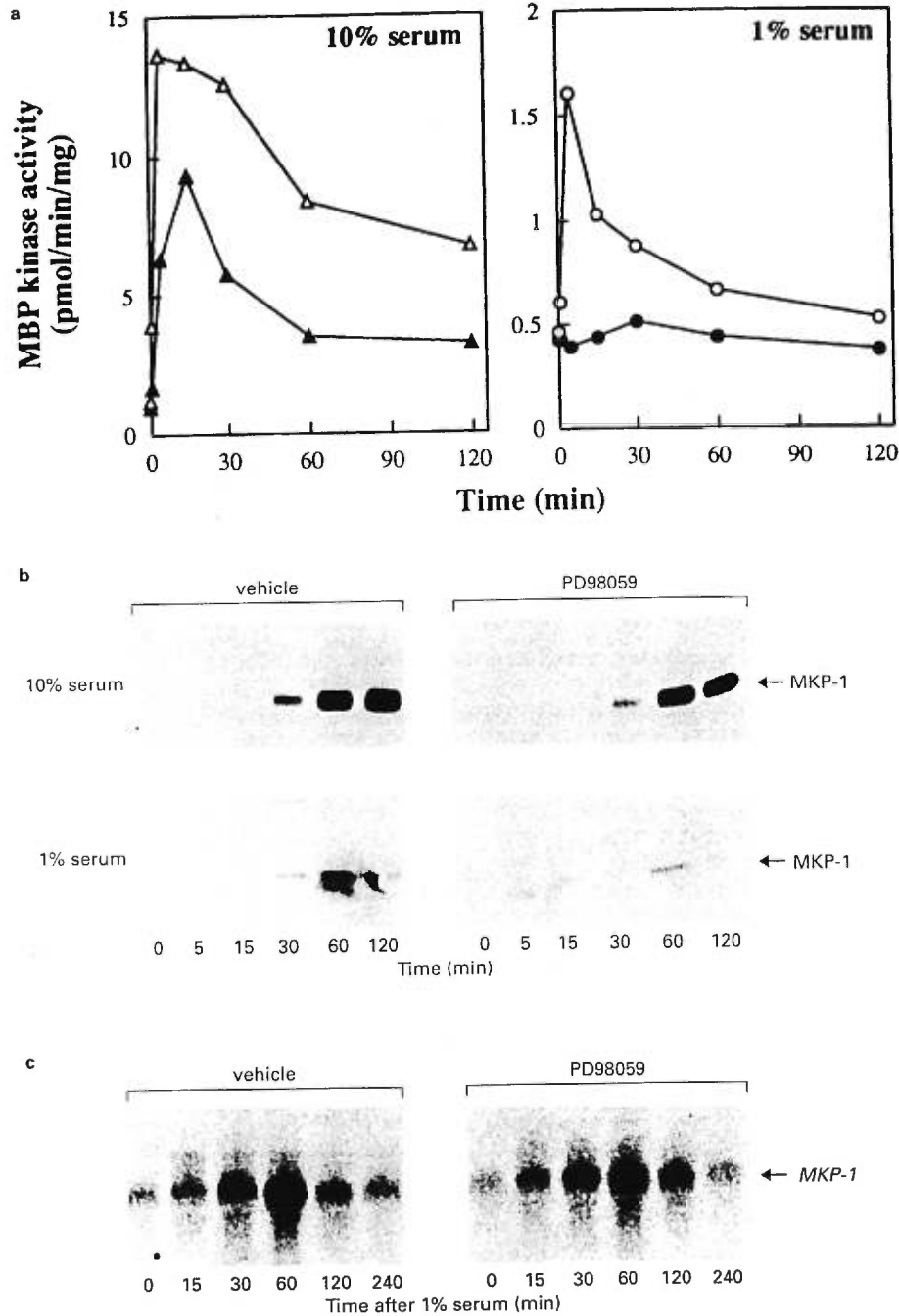


Figure 8 Effect of the MEK inhibitor PD98059 on *MKP-1* gene expression in Rat1 fibroblasts. Quiescent Rat1 fibroblasts were pre-treated for 30 min with vehicle alone (open symbols) or with 50 μ M PD98059 (closed symbols). The cells were then stimulated with 10% calf serum (Δ , ∇) or 1% calf serum (\circ , \bullet) for the indicated period of times. (a) Enzymatic activity of ERK1. Cell lysates were prepared and subjected to immunoprecipitation with a specific ERK1 antiserum. The phosphotransferase activity of ERK1 was assayed directly using MBP as substrate. The enzymatic activities are expressed as pmoles of phosphate incorporated into the substrate per min per mg of lysate protein. (b) expression of MKP-1 protein analysed by immunoblotting as described in Figure 1. (c) Expression of *MKP-1* mRNA analysed by Northern hybridization using a 32 P-labeled *MKP-1* cDNA as probe. Rehybridization of the membrane with a *GAPDH* probe confirmed that similar amounts of RNA were loaded in each lane (data not shown)

interfering with the upstream activation of the MAP kinase kinases MEK1/MEK2 (Dudley *et al.*, 1995; Alessi *et al.*, 1995; Servant *et al.*, 1996). Incubation of Rat1 cells with 50 μ M PD98059 resulted in little inhibition of MKP-1 protein expression in response to 10% serum (Figure 8b). However, in the presence of high serum concentration, PD98059 was found to only partially block the activation of ERK1 (Figure 8a). Other workers also reported that PD98059 does not inhibit the activation of ERK1/ERK2 completely when cells are stimulated with high concentrations of agonists (Alessi *et al.*, 1995; Flynn and Proud, 1996). Thus, to further evaluate the involvement of ERK1/ERK2 in the regulation of MKP-1 expression, we tested the effect of PD98059 at sub-optimal serum concentration. When Rat1 cells were stimulated with 1% serum, PD98059 completely suppressed the activation of ERK1 and, under these conditions, partially inhibited the expression of MKP-1 protein (Figure 8a and b). However, PD98059 had no significant effect on the accumulation of *MKP-1* mRNA in these cells (Figure 8c). It is important to underline that PD98059 inhibits growth factor-induced protein synthesis at this concentration (Servant *et al.*, 1996), which may explain the decrease in MKP-1 protein. These results argue that activation of MAP kinases is not an absolute requirement for the induction of *MKP-1* gene transcription by extracellular stimuli.

Discussion

MKP-1 is an immediate-early gene that is rapidly and transiently induced in response to growth factors and cellular stress. The *MKP-1* gene encodes a VH1-like dual-specificity phosphatase which exhibits catalytic activity towards MAP kinases *in vitro*. Little is known about the mechanisms that regulate *MKP-1* gene expression and about the physiological roles of the enzyme. In this study, we show that in fibroblast cells: (1) Ca^{2+} is both necessary and sufficient for the induction of *MKP-1* gene expression; and (2) activation of MAP kinases is not an absolute requirement for induction of the *MKP-1* gene.

Pharmacological experiments with various signalling inhibitors have revealed that chelation of intracellular Ca^{2+} with BAPTA completely blocks serum-induced MKP-1 expression in a time- and dose-dependent manner. The inhibitory effect of BAPTA was observed at the level of the protein and the mRNA, thereby suggesting that Ca^{2+} may be required for transcriptional activation of the *MKP-1* gene. The following observations illustrate the central role of Ca^{2+} in the regulation of MKP-1 expression. First, Ca^{2+} chelation blocks the induction of MKP-1 expression in response to all stimuli tested, including G protein-coupled receptor agonists, receptor tyrosine kinase agonists, or physical stress. Second, the Ca^{2+} requirement of MKP-1 expression is not restricted to fibroblasts but is also observed in other cell types such as vascular SMC. Third, increasing the intracellular concentration of Ca^{2+} with the ionophore A23187 is sufficient to induce the expression of MKP-1 mRNA and protein. Similar observations were made in the lymphoma cell line 2PK-3 (Mittelstadt and Defranco, 1993) and in rat aortic SMC (Duff *et al.*, 1993) using the calcium

ionophore ionomycin. It is noteworthy that the stimulatory effect of A23187 on MKP-1 expression is slightly delayed in comparison to serum and of lower magnitude. This suggests that an additional Ca^{2+} -independent pathway(s) is recruited by serum to stimulate full transcription of the *MKP-1* gene.

The mechanism by which Ca^{2+} regulates *MKP-1* gene expression is currently unknown. Ca^{2+} is a widespread second messenger which participates to a host of cellular changes including gene expression (Clapham, 1995). Elevation of intracellular Ca^{2+} levels has been shown to activate transcription of a number of eukaryotic genes through phosphorylation of transcription factors that bind to the CRE (cAMP-responsive element) (Sheng *et al.*, 1990; 1991; Dash *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1993). This effect of Ca^{2+} may be mediated by the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases (Schulman, 1993) which can phosphorylate and activate different members of the CRE-binding protein (CREB)/activating transcription factor (ATF) family, such as CREB, CREM τ and ATF-1 (Dash *et al.*, 1991; Sheng *et al.*, 1991; Shimomura *et al.*, 1996; de Groot *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1994c). In T lymphocytes, the activation of nuclear factor of activated T cells (NF-AT) is quantitatively correlated with the intracellular concentration of Ca^{2+} (Negulescu *et al.*, 1994). The influx of Ca^{2+} through voltage-sensitive Ca^{2+} channels also stimulates serum response factor (SRF)-dependent transcription in the pheochromocytoma cell line PC12 (Miranti *et al.*, 1995). Sequencing of the 5' flanking region of the mouse *MKP-1* gene revealed the presence of several consensus sequences that include one CRE, two SP1 sites, two CTF/NF1-like sites, and one E-box motif (Noguchi *et al.*, 1993). The human *MKP-1* gene is also flanked by two CREs (Kwak *et al.*, 1994). In contrast to other immediate-early genes, no serum response element (SRE) has been found. Although the role of these different elements in the transcriptional activation of *MKP-1* remains to be determined, it is tempting to speculate that the CRE may mediate the response to Ca^{2+} . In support of this hypothesis, cAMP was found to strongly induce *MKP-1* mRNA expression in NIH3T3 cells (Noguchi *et al.*, 1993).

The expression of *MKP-1* mRNA is induced by a range of stimuli that also trigger the activation of MAP kinase pathways in mammalian cells. This suggests that MAP kinase activity may be required for *MKP-1* transcription, thereby providing a feedback loop to inactivate the signalling pathway (Sun and Tonks, 1994a). In fission yeast, activation of the stress-activated MAP kinase Spc1/Sty1 leads to expression of the *pyp2+* gene in a manner dependent upon the Atf1 transcription factor (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russel, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). The *pyp2+* gene encodes a tyrosine-specific protein phosphatase which dephosphorylates Spc1/Sty1 in a feedback inhibition loop. Recently, Grumont *et al.* (1996) have provided evidence suggesting that ERK2 activation is necessary for phorbol esters and v-Ras-dependent transcription of the *Pac-1* gene in T lymphocytes. In another study, Bokemeyer *et al.* (1996) reported that expression of an active mutant of MEK kinase-1 in NIH3T3 cells leads to *MKP-1* gene induction. However, the findings reported in this study together with observations by other groups suggest that MAP

kinases are not obligatory components of the signalling pathways that regulate *MKP-1* gene expression. We have found that exposure of rat fibroblasts to the Ca^{2+} ionophore A23187 induces *MKP-1* mRNA expression without significantly activating the JNK and p38 MAP kinase pathways. Moreover, treatment with SB203580, a highly selective inhibitor of p38 MAP kinase (Lee *et al.*, 1994), had little or no effect on the induction of *MKP-1* expression by serum (data not shown). We also show that incubation of rat fibroblasts with a concentration of PD98059 that blocks ERK1/ERK2 activation does not interfere with serum-stimulated *MKP-1* mRNA expression. The observation that PD98059 partly inhibits *MKP-1* protein expression most likely reflects the inhibitory effect of the compound on protein synthesis. Indeed, we have recently demonstrated that addition of PD98059 (Servant *et al.*, 1996) or expression of a dominant-negative mutant of ERK1 (Gopalbhai K and Meloche S, unpublished data) block growth factor-stimulated protein synthesis in target cells.

Other studies also reported a lack of correlation between the activation of MAP kinases and the induction of *MKP-1* gene transcription in various cell types. For example, treatment of B lymphocytes (Mittelstadt and DeFranco, 1993) or NIH3T3 cells (Bokemeyer *et al.*, 1996) with phorbol esters was found to stimulate the phosphorylation of ERK isoforms without inducing *MKP-1* gene expression. Also, expression of a constitutively-active MEK1 mutant failed to increase *MKP-1* mRNA expression in NIH3T3 cells, whereas a dominant-negative form of the kinase potentiated serum or anisomycin-induced *MKP-1* gene expression (Bokemeyer *et al.*, 1996). In HeLa cells, treatment with the genotoxic agent methyl methanesulfonate strongly induced *MKP-1* mRNA expression but had little effect on ERK1/ERK2 activity (Liu *et al.*, 1995). In murine macrophages expressing an oncogenic $\Delta\text{Raf-1}$: estrogen receptor ($\Delta\text{Raf-1-ER}$) fusion protein, the *MKP-1* gene was shown to be induced in response to lipopolysaccharide stimulation but not in response to activation of $\Delta\text{Raf-1-ER}$ with estradiol, despite the rapid and prolonged activation of ERK1/ERK2 (Hambleton *et al.*, 1995). Finally, treatment of Rat1 cells with the PKC inhibitor Ro-31-8220 was recently reported to activate the JNK pathway, but to inhibit growth factor-stimulated expression of *MKP-1* (Beltman *et al.*, 1996). Taken together, these observations indicate that activation of signalling pathways other than the three known MAP kinase modules is required for full transcription of the *MKP-1* gene.

Materials and methods

Materials and antibodies

Tissue culture reagents and epidermal growth factor were purchased from Life Technologies. Thrombin, 2-aminopurine, bovine myelin basic protein (MBP), anisomycin, and protease inhibitors were from Sigma. Angiotensin II was obtained from Hukabel Scientific. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), K-252a, and genistein were from LC Services. BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester) and A23187 were from Calbiochem. Go6976 and herbimycin A

were from Biomol. CGP41251 and the biologically inactive analogue CGP42700 were gifts from Ciba-Geigy. [γ - ^{32}P]ATP was from Amersham Corp. PD98059 was a gift from Parke-Davis. The bacterial expression plasmids encoding GST-ATF2 and GST-c-Jun were kindly provided by Dr Roger Davis (University of Massachusetts) and Dr Jim Woodgett (Ontario Cancer Institute), respectively. The recombinant fusion proteins were expressed in *E. coli* and purified as described (Guan and Dixon, 1991b).

The anti-MKP-1 polyclonal antibody was obtained from Santa-Cruz Biotechnology. Antiserum SM1 has been described and specifically immunoprecipitates ERK1 isoform (Meloche, 1995). The polyclonal antibodies to JNK2 and p38 were generously provided by Dr Jacques Landry (Université Laval).

Cell culture

Rat1 cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% calf serum, 2 mM glutamine and antibiotics (Meloche, 1995). They were made quiescent by incubation in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (1:1) containing 15 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mg/ml BSA for 24 h. Rat aortic SMC were cultured and synchronized as described previously (Giasson and Meloche, 1995).

Immunoblot analysis of MKP-1

Following stimulation with the indicated agents, the cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10^{-4} M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10^{-6} M leupeptin, 10^{-6} M pepstatin A, 1% Triton X-100). After 25 min at 4°C, the lysates were clarified by centrifugation at $13\,000\times g$ for 10 min at 4°C. Equal amounts of lysate proteins (100 μg) were subjected to SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels and transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine. Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dry milk and 0.05% Tween-20 for 45 min at 37°C prior to incubation for 60 min at room temperature with anti-MKP-1 antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in blocking solution. The membranes were washed three times in TBS containing 0.05% Tween-20 (TBST) prior to incubation for 30 min at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:10 000 in blocking solution. After washing as above, the immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham).

Protein kinase assays

The enzymatic activity of JNK2, ERK1 and p38 was measured by specific immune complex kinase assays using GST-c-Jun, MBP and GST-ATF2 as substrates, respectively. The assay of ERK1/ERK2 has been described previously (Meloche, 1995; Giasson and Meloche, 1995). For JNK2 assays, cell lysates were prepared as described above and 500 μg of proteins were incubated for 2 h at 4°C with 2 μl of anti-JNK2 antibody preadsorbed to protein A-Sepharose (Pharmacia) beads. The immune complexes were washed three times with lysis buffer and once with JNK assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 20 mM MgCl_2 , 2 mM dithiothreitol (DTT), 20 mM β -glycerophosphate, 100 μM sodium orthovanadate). The beads were then resuspended in 40 μl of JNK assay buffer containing 1 μg GST-c-Jun, 50 μM ATP and 5 μCi [γ - ^{32}P]ATP. The reaction was initiated with ATP, incubated at 30°C for 15 min, and stopped by addition of $2\times$ Laemmli's sample buffer. The

samples were analysed by SDS-gel electrophoresis and autoradiography.

For p38 assays, 150 µg of lysate proteins were incubated for 2 h at 4°C with 5 µl of anti-p38 antibody coupled to protein A-Sepharose. The immune complexes were washed as above. The beads were then resuspended in 20 µl of p38 kinase assay buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 25 mM β-glycerophosphate, 100 µM sodium orthovanadate) containing 1 µg GST-ATF2, 50 µM ATP, and 3 µCi [^γ-³²P]ATP. The enzymatic reaction was carried out at 30°C for 30 min and analysed as described for JNK2.

Northern blot analysis

Total RNA was extracted by a modified version of the guanidinium thiocyanate procedure as described (Chomczynski and Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Equal amounts of total RNA (15–25 µg) were denatured by heating for 15 min at 65°C in 2.2 M formaldehyde and 50% formamide and resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel containing 1.8% formaldehyde. The RNA were transferred to Hybond-N membranes (Amersham), fixed, and hybridized with ³²P-labeled probes. Hybridization was carried out in hybridization medium [5 × SSC (1 × SSC = 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 0.1% SDS, 5 × Denhardt's solution (1 × Denhardt's = 0.02% Ficoll 400, 0.02% polyvinyl pyrrolidone and 0.02% bovine serum albumin), 50% formamide, and 100 µg/ml herring sperm DNA] containing the labeled probe (1–2 × 10⁶ c.p.m./ml) for 16 h at 42°C. The membranes were

washed twice at 25°C for 15 min in 2 × SSC, 0.1% SDS and twice at 60°C for 30 min in 0.5 × SSC, 0.1% SDS. The extent of hybridization was analysed with a phosphorimager apparatus (Molecular Dynamics). The results were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA.

The probes used were: a 1.2 kb PvuII–NotI fragment of human *MKP-1* cDNA (provided by Dr Stephen Keyse, ICRF), and a 1.2 kb XbaI–PstI fragment of rat *GAPDH* cDNA. All the probes were labeled by random priming.

Other methods

Protein concentrations were measured using the BCA protein assay kit (Pierce) with bovine serum albumin as standard.

Acknowledgements

We thank Drs A Suter, A Saltiel, RJ Davis, J Woodgett, J Landry and SM Keyse for reagents. We also thank E Pérès for preparation of the figures and I Rémillard for secretarial assistance. This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada. J-C Scimeca is recipient of a fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer and invited scientist of the Fonds de la recherche en santé du Québec, MJ Servant is recipient of a Heart and Stroke Foundation of Canada studentship and S Meloche is a Scholar of the Medical Research Council of Canada.

References

- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S-i, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y. (1987). *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592–5595.
- Alessi DR, Smythe C and Keyse SM. (1993). *Oncogene*, **8**, 2015–2020.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT and Saltiel AR. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489–27494.
- Beltman J, McCormick F and Cook SJ. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 27018–27024.
- Bokemeyer D, Sorokin A, Yan M, Ahn NG, Templeton DJ and Dunn MJ. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 639–642.
- Brondello JM, McKenzie FR, Sun H, Tonks NK and Pouyssegur J. (1995). *Oncogene*, **10**, 1895–1904.
- Cano E and Mahadevan LC. (1995). *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 117–122.
- Charles CH, Abler AS and Lau LF. (1992). *Oncogene*, **7**, 187–190.
- Charles CH, Sun H, Lau LF and Tonks NK. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5292–5296.
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987). *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Chomczynski P. (1993). *BioTechniques*, **15**, 532–537.
- Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ and Kelly K. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 6497–6501.
- Clapham DE. (1995). *Cell*, **80**, 259–268.
- Cobb MH, Boulton TG and Robbins DJ. (1991). *Cell Regul.*, **2**, 965–978.
- Cobb MH and Goldsmith EJ. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 14843–14846.
- Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R and Kandel ER. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5061–5065.
- Davis RJ. (1994). *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 470–473.
- de Groot RP, den Hertog J, Vandenhede JR, Goris J and Sassone-Corsi P. (1993). *EMBO J.*, **12**, 3903–3911.
- De Jonge PC, Wieringa T, Van Putten JP, Krans HM and Van Dam K. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 219–225.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ and Saltiel AR. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7686–7689.
- Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, Charles CH, Lau LF, Bernstein KE and Berk BC. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 26037–26040.
- Flynn A and Proud CG. (1996). *FEBS Lett.*, **389**, 162–166.
- Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV and Kyriakis JM. (1996). *Circ. Res.*, **78**, 947–953.
- Fukuda M, Gotoh Y, Tachibana T, Dell K, Hattori S, Yoneda Y and Nishida E. (1995). *Oncogene*, **11**, 239–244.
- Giasson E and Meloche S. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 5225–5231.
- Grumont RJ, Rasko JEJ, Strasser A and Gerondakis S. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2913–2921.
- Guan K, Broyles SS and Dixon JE. (1991). *Nature*, **350**, 359–362.
- Guan KL and Dixon JE. (1991b). *Anal. Biochem.*, **192**, 262–267.
- Guan KL and Butch E. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 7197–7203.
- Hambleton J, McMahon M and DeFranco AL. (1995). *J. Exp. Med.*, **182**, 147–154.
- Han J, Lee JD, Bibbs L and Ulevitch RJ. (1994). *Science*, **265**, 808–811.
- Ishibashi T, Bottaro DP, Chan A, Miki T and Aaronson SA. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12170–12174.
- Ishibashi T, Bottaro DP, Michieli P, Kelley CA and Aaronson SA. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 29897–29902.
- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A and Kaneko M. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 436–440.
- Keyse SM and Emslie EA. (1992). *Nature*, **359**, 644–647.
- Keyse SM. (1995). *Biochim. Biophys. Acta*, **1265**, 152–160.
- King AG, Ozanne BW, Smythe C and Ashworth A. (1995). *Oncogene*, **11**, 2553–2563.
- Kwak SP, Hakes DJ, Martell KJ and Dixon JE. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 3596–3604.

- Kwak SP and Dixon JE. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 1156–1160.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MR, Avruch J and Woodgett JR. (1994). *Nature*, **369**, 156–160.
- L'Allemain G. (1994). *Prog. Growth Factor Res.*, **5**, 291–334.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JR and Young PR. (1994). *Nature*, **372**, 739–746.
- Liu F, Thompson MA, Wagner S, Greenberg ME and Green MR. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 6714–6720.
- Liu Y, Gorospe M, Yang C and Holbrook NJ. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 8377–8380.
- Mahadevan LC, Wills AJ, Hirst EA, Rathjen PD and Heath JK. (1990). *Oncogene*, **5**, 327–335.
- Marte BM, Meyer T, Stabel S, Standke GJR, Jaken S, Fabbro D and Hynes NE. (1994). *Cell Growth Differ.*, **5**, 239–247.
- Martell KJ, Seasholtz AF, Kwak SP, Clemens KK and Dixon JE. (1995). *J. Neurochem.*, **65**, 1823–1833.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmè D and Schächtele C. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 9194–9197.
- Meloche S. (1995). *J. Cell. Physiol.*, **163**, 577–588.
- Meyer T, Regenass U, Fabbro D, Alteri E, Rösel J, Müller M, Caravatti G and Matter A. (1989). *Int. J. Cancer*, **43**, 851–856.
- Millar JBA, Buck V and Wilkinson MG. (1995). *Genes Dev.*, **9**, 2117–2130.
- Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T and Greenberg ME. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3672–3684.
- Misra-Press A, Rim CS, Yao H, Roberson MS and Stork PJS. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 14587–14596.
- Mittelstadt PR and DeFranco AL. (1993). *J. Immunol.*, **150**, 4822–4832.
- Mourey RJ, Vega QC, Campbell JS, Wenderoth MP, Hauschka SD, Krebs EG and Dixon JE. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 3795–3802.
- Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou J-C, Martinou I, Camps M, Schlegel W and Arkininstall S. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 4319–4326.
- Negulescu PA, Shastri N and Cahalan MD. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2873–2877.
- Noguchi T, Metz R, Chen L, Mattèi MG, Carrasco D and Bravo R. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5195–5205.
- Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 7420–7426.
- Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U and Kelly K. (1993). *Science*, **259**, 1763–1766.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Lamazares A, Zamanillo D, Hunt T and Nebreda AR. (1994). *Cell*, **78**, 1027–1037.
- Schulman H. (1993). *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **5**, 247–253.
- Servant MJ, Giasson E and Meloche S. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 16047–16052.
- Sheng M, McFadden G and Greenberg ME. (1990). *Neuron*, **4**, 571–582.
- Sheng M, Thompson MA and Greenberg ME. (1991). *Science*, **252**, 1427–1430.
- Shimomura A, Ogawa Y, Kitani T, Fujisawa H and Hagiwara M. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 17957–17960.
- Shiozaki K and Russel P. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 2276–2288.
- Sun H, Charles CH, Lau LF and Tonks NK. (1993). *Cell*, **75**, 487–493.
- Sun H and Tonks NK. (1994a). *Trends Biochem. Sci.*, 480–485.
- Sun H, Tonks NK and Bar-Sagi D. (1994b). *Science*, **266**, 285–288.
- Sun, P Enslin H, Myung PS and Maurer RA. (1994c). *Genes Dev.*, **8**, 2527–2539.
- Uehara Y, Fukazawa H, Murakami Y and Mizuno S. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 803–809.
- Ward Y, Gupta S, Jensen P, Wartmann M, Davis RJ and Kelly K. (1994). *Nature*, **367**, 651–654.
- Waskiewicz AJ and Cooper JA. (1995). *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**, 798–805.
- Wilkinson MG, Samuels M, Takeda T, Toone WM, Shieh JC, Toda T, Millar JBA and Jones N. (1996). *Genes Dev.*, **10**, 2289–2301.
- Zheng C-F and Guan K-L. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 16116–16119.