

2m11.2855.1

Université de Montréal

Le rôle de phosphatidylinositol 3-kinase dans la croissance des fibroblastes cardiaques de rats néonataux

Par

Federico Colombo

Programme de physiologie

Faculté des Études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des Études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en science (M.Sc.)
en physiologie

Septembre 2000

© Federico Colombo, 2000



1.232.1

Université de Montréal

Le rôle de phosphatidylinositol 3-kinase dans la croissance des
lipoblastes cardiaques de rats nourris

W
4
N58
2001
N.060

Monsieur le recteur de l'Université de Montréal
pour le directeur de la bibliothèque
Monsieur le directeur de la bibliothèque
de la Faculté de Médecine



Bibliothèque de la Faculté de Médecine

Bibliothèque de la Faculté de Médecine

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle de phosphatidylinositol 3-kinase dans la croissance des
fibroblastes cardiaques de rats néonataux**

Présenté par

Federico Colombo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Madhu Srivastava

.....
président-rapporteur

Angelo Calderone

.....
directeur de recherche

Ashok K. Srivastava

.....
membre du jury

Mémoire accepté le : 27 février 2001

Sommaire

Le but de cette maîtrise est d'étudier les différentes voies de signalisations impliquées dans la croissance des fibroblastes cardiaques médié par l'Isoprotérénol (ISO). En utilisant des cultures de fibroblastes cardiaques de rats nouveaux-nés, nous avons démontré que le traitement des fibroblastes cardiaques avec l'isoprotérénol augmentait la synthèse d'ADN. De plus, de façon simultanée, le traitement avec ISO a aussi augmenté la concentration d'AMPc intracellulaire. Cependant, le traitement des cellules avec la forskoline (agent qui augmente la concentration d'AMPc intracellulaire) ou le 8-bromo-AMPc (analogue de l'AMPc), a causé une diminution de la synthèse d'ADN. Le traitement avec la toxine de Pertussis a eu aucun effet sur la synthèse d'ADN, et ISO n'a pas augmenté la concentration de l'inositol 1,4,5-triphosphate, ce qui suggère que les événements reliés à G_i/G_q ne sont pas impliqués dans la synthèse d'ADN médié par ISO. Le pré-traitement avec deux inhibiteurs de protéines tyrosine kinase a significativement diminué la synthèse d'ADN stimulée par ISO. Le pré-traitement avec le BMS-191563 a causé une redistribution de ras à la région périnucléaire et nucléaire, tout en atténuant la synthèse d'ADN stimulée par ISO. Deux événements tyrosine kinases-dépendant, ERK et PI3-K ont été recrutés par ISO. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques contre ERK et PI3-K démontre que le recrutement de PI3-K est essentiel à la synthèse d'ADN médié par ISO. En accord avec ces résultats, l'inhibition d'une des cibles de PI3-K, la p70S6K, a

aussi inhibé la synthèse d'ADN médié par ISO. Bref, cette étude est la première qui démontre que la synthèse d'ADN au niveau des fibroblastes cardiaques stimulés par ISO, ce fait via le recrutement essentiel de ras et de PI3-K, malgré le recrutement d'une voie AMPc-dépendante.

Le second objectif de ce mémoire est d'étudier les voies de signalisations couplées à la synthèse protéique médié soit par Ang II soit par ISO et de vérifier si ces voies sont similaires ou distinctes. Le prétraitement avec l'inhibiteur des tyrosine kinases, le tyrphostine A25, a inhibé la synthèse protéique stimulé par ISO mais n'a pas affecté la synthèse protéique induit par Ang II. Le pré-traitement avec le BMS-191563, a diminué la synthèse protéique induite par ISO mais n'a pas atténué la synthèse protéique stimulée par Ang II. Le pré-traitement avec le PD098059, un inhibiteur de MEK-1/MEK-2, a inhibé l'activation de ERK stimulé soit par ISO soit par Ang II. Cependant, le PD098059 n'a pas affecté la synthèse protéique induite par ISO ou Ang II. Outre l'activation de ERK, le traitement avec ISO ou Ang II a aussi augmenté l'activité de PI3-K. Le pré-traitement avec le LY294002, un inhibiteur de PI3-K a inhibé la synthèse protéique médié soit par ISO soit par Ang II.

Bref, cette étude est la première à démontrer que la synthèse protéique stimulée par Ang II et ISO sont distinctes où l'Ang II stimule la synthèse protéique via le recrutement de PI3-K et ISO stimule la synthèse protéique via le recrutement de ras et de PI3-K.

Liste des Abréviations

AC	: Adénylate cyclase
ACE	: <<Angiotensin converting enzyme>>
ADN	: Acide déoxyribonucléique
Ang II	: <<Angiotensin II>>
ARNm	: <<Acide ribonucléique messenger>>
ECE	: <<Endothelin converting enzyme>>
E	: Epinéphrine
ET	: Endothéline
EGF	: <<Endothelial growth factor>>
ERK	: <<Extracellular regulated kinase>>
GDP	: Guanine diphosphate
Grb2	: <<Growth factor binding protein 2>>
GTP	: Guanosine triphosphate
IGF	: <<Insulin growth factor>>
PDGF	: <<Platelet derived growth factor>>
PI	: Phosphatidylinositol
PI3-K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
MEC	: Matrice extracellulaire
MMP	: Métalloprotéase
mSOS	: Mammalian son of sevenless
NE	: Norépinéphrine

- PLC** : Phospholipase C
- TIMP** : <<Tissue inhibitor of matrix metalloprotease>>
- SNS** : Système nerveux sympathique
- Src** : << Sarcoma rous virous>>

Remerciements

J'aimerais remercier en premier lieu mon directeur de recherche, Dr Angelino Calderone, qui ma donné la chance d'exercer un merveilleux projet de recherche et qui a su me donner de bons conseils tant au niveau de la recherche qu'au niveau personnel. Encore une fois merci pour la confiance que vous m'avez donné pendant ces deux dernières années.

En deuxième lieu, j'aimerais remercier tous ceux qui m'ont côtoyé durant mes deux années de maîtrise, surtout mes coéquipiés de laboratoire Nadia Abdelaziz et Isabelle Mercier, qui m'ont rendu fou et m'ont fait perdre pas mal de cheveux !!! . J'aimerais aussi remercier le Dr Pandey du laboratoire du Dr Ashok Srivastava pour m'avoir appris la technique pour mesurer l'activité de PI3-K. Que dire de mes amis Joe Fuoco(pour m'avoir rendu plus fou) et Sandro Masciotra (Tizianna, je ne t'ai pas oublié, merci pour ton expertise), Merci les gars !

Finalement, j'aimerais remercier mes parents Francesco et Francine, pour m'avoir donnés la chance d'étudier et mes frères Tony et Sandro pour m'avoir supporté pendant ces deux dernières années.

Pour conclure, je voudrais remercier une personne très spéciale avec qui j'ai partagé les trois dernières années de ma vie et qui m'a vraiment supporté, surtout lors de ma rédaction, Seta Kevorkian, Merci beaucoup.

Je dédis ce mémoire à ma famille et à ma petite Seta Kevorkian

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Liste des Abréviations.....	v
Remerciements	vii
Liste des figures.....	2
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1.0 Introduction	5
1.1 Fibrose cardiaque	6
1.1.1 Différents types de fibrose cardiaque	6
1.1.2 Conséquence de la fibrose cardiaque	9
1.2 Rôle de la Matrice extracellulaire au niveau du cœur physiologique	10
1.2.1 Composition de la Matrice Extracellulaire.....	12
1.2.1.1 Les Collagènes	12
1.2.1.2 Les Fibronectines.....	14
1.2.1.3 Protéoglycanes et élastines	15
1.2.2 Régulation de la synthèse de la matrice extracellulaire et sa dégradation.....	15
1.2.3 Métalloprotéinases et TIMP's	16
1.3 Croissance Cellulaire.....	17
1.3.1 La Voie MAPK	18
1.3.2 La voie du Phosphatidylinositol 3-Kinase	22
1.3.2.1 Classification des Phosphatidylinositol 3-kinases	24
1.3.2.2 PI3-K de Classe I	24
1.3.2.2 PI3-K de classe IB.....	27
1.3.2.3 PI3-K de Classe II	27
1.3.2.5 PI3-K de Classe III	28
1.3.3 Les effecteurs de PI3-K	28
1.3.4 Angiotensine II et la voie de PI3-K.....	30
1.4 Facteurs impliqués dans la croissance des fibroblastes cardiaques ..	31
1.4.1 Le système rénine-angiotensine.....	31
1.4.2 Angiotensine II et la fibrose cardiaque.....	33

1.4.3 Effet d'Angiotensine II sur la croissance des fibroblastes cardiaques ..	34
1.5 Le système sympathique.....	35
1.5.1 Le système sympathique et la fibrose cardiaque.....	37
1.5.2 Voies de signalisations couplées aux récepteurs β_2 -adrénergiques.....	37
1.6 Objectifs de cet mémoire.....	39
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	40
2.1 Culture des fibroblastes cardiaques de rats nouveaux-nés.....	41
2.2 Mesure de la synthèse d'ADN et de la synthèse protéique à l'aide de [³H]- thymidine et [³H]-leucine.....	42
2.3 Mesure de la concentration de l'AMPc intracellulaire et de l'inositol phosphate.....	44
2.4 Immunofluorescence de ras.....	44
2.5 Mesure de l'activité de ERK et de PI3-K.....	45
2.6 Analyse par Immuno-buvardage des résidus tyrosine phosphorylés de ERK	48
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	49
Première partie	50
3.1 Isoprotérénol stimule la synthèse d'ADN dans les fibroblastes cardiaques de rats néonataux Via le recrutement de p21^{ras} et le phosphatidylinositol 3-kinase.....	50
3.1.1 Isoprotérénol(ISO) stimule la synthèse d'ADN via une voie AMPc-indépendante.....	50
3.1.2 Les événements couplés aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ ne sont pas couplés à la synthèse d'ADN médié par ISO.....	52
3.1.4 La synthèse d'ADN stimulée par ISO est reliée à des événements tyrosine kinases dépendentes	53
3.1.4 L'inhibiteur de la farnesyltransférase, le BMS-191563 a diminué la synthèse d'ADN stimulé par ISO	55
3.1.5 ISO active MAPK et PI3-K dans les fibroblastes cardiaques.....	57
3.1.6 Le recrutement de PI3-K est un événement essentiel à la synthèse d'ADN stimulée par ISO	60

Deuxième partie	63
3.2 Isoprotérénol et Angiotensine II stimule la synthèse protéique au niveau des fibroblastes cardiaques via une voie PI3-K dépendante.....	63
3.2.1 Angiotensine II et Isoprotérénol stimule la synthèse protéique :.....	64
3.2.2 Le rôle des protéines tyrosine kinase dans la synthèse protéique médié par l'angiotensine II et l'isoprotérénol :	66
3.2.3 Le rôle de ras dans la synthèse protéique médié par angiotensine II et isoprotérénol.....	68
3.2.4 Le recrutement de ERK via ras par Angiotensine II et Isoprotérénol, est un événement insuffisant pour promouvoir la synthèse protéique	70
3.2.5 Angiotensine II et Isoprotérénol stimule la synthèse protéique via le recrutement d'une voie PI3-Kinase-dépendante.....	73
CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION.....	77
4.1 DISCUSSION.....	78
4.1.1 Première partie	78
4.1.2 Deuxième partie	86
4.2 Conclusion.....	89
CHAPITRE 5 RÉFÉRENCES	91

Liste des figures

Figure 1.1 : Caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque	7
Figure 1.2 : Voies couplées aux récepteurs tyrosine kinases	19
Figure 1.3 : Voie de signalisations liées à ras	21
Figure 1.4 : Structure du phosphatidylinositol	24
Figure 1.5 : Classification des membres de la famille PI3-K	26
Figure 1.6 : Formation d'Angiotensine II	32
Figure 3.1A et B L'effet de l'Isoprotérénol(ISO) sur la croissance des fibroblastes cardiaques	51
Figure 3.2 L'effet des inhibiteurs des tyrosine kinases sur la synthèse d'ADN	54
Figure 3.3A et B L'effet du BMS-191563 sur la distribution cellulaire de ras	56
Figure 3.4A Activation temporelle de ERK et PI3-K par ISO	58
Figure 3.4B Autoradiogramme représentant l'activation de Erk par ISO	59
Figure 3.4C Autoradiogramme représentant l'activation de PI3-K	59
Figure 3.5 A PD98059 inhibe l'activation de ERK par ISO et Ang II	61
Figure 3.5 B L'effet de PD98059 sur la synthèse d'ADN médié par ISO	61
Figure 3.6 A L'effet de LY294002 sur l'activation de PI3-K par ISO	62
Figure 3.6 B L'effet de LY294002 sur la synthèse d'ADN	62
Figure 3.7 Ang II stimule la synthèse protéique	65
Figure 3.8 L'effet de la tyrphostin A25 sur la synthèse protéique médié par ISO et Ang II	67
Figure 3.9 L'effet du BMS-191563 sur la synthèse protéique médié par ISO et Ang II	69

Figure 3.10 L'effet du BMS-191563 sur l'activation de ERK stimulé par ISO et Ang II	71
Figure 3.11A et B Autoradiogramme de l'activation de PI3-K stimulé par ISO et Ang II	74
Figure 3.12 L'effet de LY294002 sur la synthèse protéique stimulé par ISO et Ang II	76

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.0 Introduction

Chaque année, plus de 19 000 personnes meurent au Québec à cause des maladies cardiovasculaires(1). Les causes reliées à ces maladies sont multiples : tabagisme, alimentation, obésité, sédentarité, diabète, hypertension (1). Il est donc important de bien comprendre les mécanismes qui mènent à la défaillance de cette pompe biologique, pour ainsi être en mesure de développer des composés pharmacologiques capables de prolonger la vie ou même d'enrayer le problème du patient.

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) pathologique constitue le principal facteur à risque relié à l'insuffisance cardiaque selon l'étude de Framingham.(2) Dans un premier temps, cette hypertrophie est un mécanisme compensatoire qui permet au cœur de garder intacte sa fonction de pompe due à une surcharge hémodynamique. Cependant, à plus ou moins long terme ce mécanisme dit compensatoire entre en état décompensatoire. Ce dernier est caractérisé par des irrégularités au niveau de la contractilité ventriculaire mène ultimement à la défaillance cardiaque (3,4,5,6). Au niveau cellulaire, cette hypertrophie se caractérise par un élargissement des cardiomyocytes sans changement de leur nombre et une prolifération des fibroblastes cardiaques. Au niveau moléculaire, on observe chez les cardiomyocytes, une ré-expression des gènes fœtaux (pré-pro-ANF) et au niveau des fibroblastes, on observe une surexpression de protéines structurales comme le collagène et la fibronectine (fig 1.1).

Les mécanismes impliqués dans la transition de l'hypertrophie cardiaque compensatoire à l'hypertrophie décompensatoire sont multifactorielles. Ainsi, le développement de la fibrose interstitielle fut démontré comme étant un de ces déterminants importants dans le développement de l'insuffisance cardiaque (4). Ceci dit, la prochaine section portera sur la fibrose cardiaque et ses conséquences.

1.1 Fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque est souvent associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) pathologique.(4) Elle est caractérisée par deux éléments fondamentaux : 1) par une prolifération anormale des fibroblastes cardiaques, et 2) par une synthèse accrue des protéines faisant partie de la matrice extracellulaire(MEC) (principalement du collagène de type I et III et de la fibronectine) et de leur dépôt dans le milieu interstitiel(4). Ces deux événements ont comme conséquence de diminuer la contractilité cardiaque menant principalement à la défaillance cardiaque.

1.1.1 Différents types de fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque se manifeste dans différentes circonstances principalement sous trois types, qui selon la sévérité du problème, peut être soit bénéfique, soit problématique pour la fonction cardiaque(4) :

Hypertrophie cardiaque

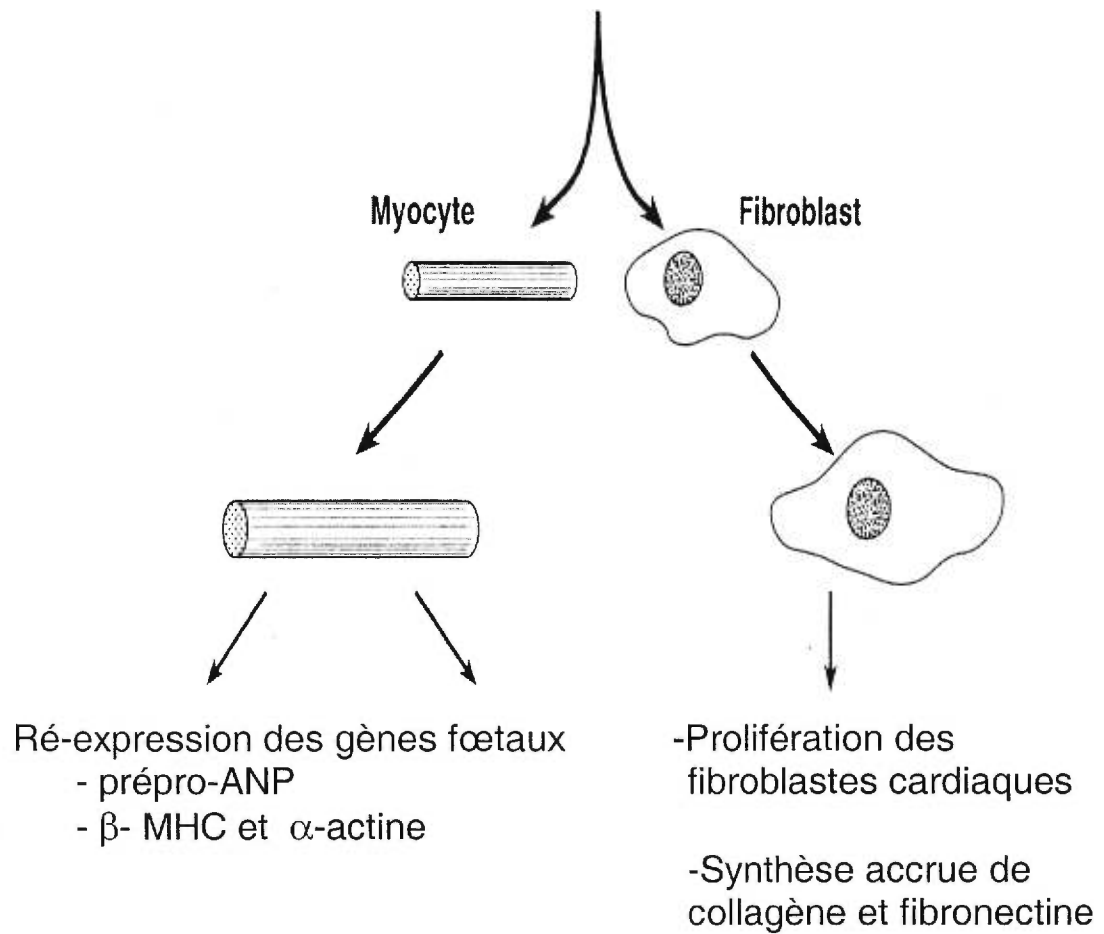


Figure 1.1 Caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque

1) La fibrose réparative : ce type de fibrose est observé lorsqu' il y a nécrose des cardiomyocytes qui sont remplacés par une cicatrice microscopique composée de fibroblastes cardiaques(4). La fibrose réparative est un processus initialement bénin qui permet d'éviter l'éruption de la cavité ventriculaire gauche lors de l'ischémie cardiaque. Cependant, à long terme, elle affecte la contractilité ventriculaire. 2) La fibrose périvasculaire : Caractérisée par une augmentation de protéines faisant partie de la MEC au niveau de l'adventia des artères coronaires(4) et 3) la fibrose interstitielle : Caractérisée par une augmentation de protéines structurales dans la MEC qui entourent les cardiomyocytes ce qui diminue aussi la contractilité ventriculaire(4).

1.1.2 Conséquence de la fibrose cardiaque

La prolifération anormale des fibroblastes cardiaques et le dépôt excessif des constituants de la matrice extracellulaire dans le milieu interstitiel durant la surcharge de pression, pourrait expliquer l'apparition de l'insuffisance cardiaque(4). Plusieurs études ont été entreprises dans le but de caractériser les différentes étapes dans le développement de la fibrose. Ils ont permis de vérifier la conséquence de cette accumulation de collagène dans la MEC sur la contractilité ventriculaire en utilisant le modèle d'hypertension rénovasculaire chez les primates non humains et chez le rat (4). Quelques semaines après l'induction de l'hypertension rénovasculaire, ils ont observé un début d'œdème au niveau de l'interstitium du myocarde. Par la suite, l'œdème disparaît et il y a accumulation de collagène. Cette accumulation débute au niveau des vaisseaux intramyocardiques et par la suite se propage dans le milieu interstitiel du myocarde(4). Après 8 semaines, la fraction de collagène a doublé et 12 semaines plus tard, elle a triplé. Des études additionnelles ont démontré qu'après 32 semaines d'hypertension rénovasculaire, le collagène occupait 18 % du ventricule gauche. En parallèle avec ces expériences, cette même étude ont démontré l'impact de l'accumulation de collagène sur la contractilité ventriculaire(4). Au bout de 8 à 12 semaines d'hypertension rénovasculaire augmentent la rigidité diastolique ce qui se traduit par une augmentation de la force générée par le myocarde, préservant ainsi la fonction systolique(4). Cependant, à 32 semaines, le même groupe de chercheurs ont observé une dysfonction diastolique au repos avec une

pression élevée lors du remplissage ventriculaire qui s'accompagne d'une dysfonction systolique et d'une dilatation de la cavité ventriculaire(4). En conclusion, l'ensemble de ces études démontrent que l'accumulation de collagène demeure le facteur principal responsable des anomalies contractiles rencontrées dans ce modèle qui affecte premièrement la diastole deuxièmement affecte la systole, contribuant ainsi à la défaillance cardiaque.

1.2 Rôle de la Matrice extracellulaire au niveau du cœur physiologique

Les fibroblastes cardiaques sont responsables de la biosynthèse (sauf du collagène type IV et des laminines) et de la dégradation de la matrice extracellulaire (7-10). La MEC est composée d'un réseau complexe qui comprend des protéines fibreuses et des protéoglycanes (7-10). Ces composantes sont importantes car elles permettent de soutenir le réseau vasculaire et neurohormonale qui irrigue le cœur. De plus, la MEC permet un transfert efficace de la force générée par les cardiomyocytes pour ainsi optimiser la contractilité cardiaque. (9)

Dans le cœur sain, un équilibre entre la production de la MEC et sa dégradation est essentielle pour maintenir une fonction adéquate du cœur.(8) Cet équilibre est possible grâce à trois mécanismes régulateurs(8) : 1) la synthèse de nouvelles protéines ainsi que leur dépôt dans la matrice extracellulaire. 2) Dégradation de la MEC par des métalloprotéases (MMP's) et 3) L'inhibition de la MEC par des inhibiteurs endogènes des MMP's,

synthétisée par les fibroblastes, connue sous le nom de "Tissue inhibitor of metalloproteinase "(TIMP's)(8).

Tout déséquilibre de ce système aura des répercussions négatives sur la contractilité cardiaque.

1.2.1 Composition de la Matrice Extracellulaire

Dans le myocarde, la MEC est composée de différents types de collagène, de glycoprotéines, de protéoglycanes et d'élastine(7-10). Ces protéines interagissent entre elles pour assurer une bonne fonction cardiaque.

1.2.1.1 Les Collagènes

Le collagène est le principal constituant de la MEC(11). On les retrouve dans plusieurs organes sous onze types de collagène où l'expression des différents types est spécifique au tissu (11). Au niveau du myocarde, on retrouve les types I, III, IV, V et VI (7,8). Le collagène mature est composé soit de trois chaînes polypeptidiques (identiques, ou de trois différentes chaînes α , ou de deux chaînes α) (tableau 1)

Le collagène de type I et III sont les plus abondants dans le myocarde. Ensemble ils représentent plus de 90 % du collagène total retrouvé au niveau du myocarde, principalement entre les cardiomyocytes (8-10). Les collagènes de type I s'y agrègent pour former des fibres épaisses, tandis que les collagènes de types III s'y agrègent pour former des fibres plus fines. (12) De façon intéressante, les collagènes de types I et III sont les isoformes qui sont surexprimés lors de changements hémodynamiques(12). Finalement les collagènes de type IV, V et VI se retrouvent en plus petite quantité et représentent ensemble environ 10 % du collagène total du

TYPE	COMPOSITION	MASSE MOLÉCULAIRE
I	[2 α_1 (I)]; [1 α_2 (I)] Hétérotrimère	95 KDa
III	[3 α_1 (III)] Homotrimère	95 KDa
IV	[1 α_1 (IV) ; 1 α_2 (IV)] Hétérodimère	185 KDa
V	[1 α_1 (V) ; 1 α_2 (V) ; 1 α_3 (V)] Hétérotrimère	N/A
VI	[1 α_1 (VI) ; 1 α_2 (VI) ; 1 α_3 (VI)] Hétérotrimère	α_1 -150 α_2 -160-280 α_3 -140

Tableau 1 : Différents types de collagène retrouvés au niveau du cœur.

myocarde. Le collagène de type IV est situé au niveau de la membrane basale qui entoure les cardiomyocytes et les fibroblastes où il joue un rôle crucial dans l'adhésion. (4,9,10). Le collagène de type V coexiste avec le collagène de type IV au niveau de la membrane basale. On retrouve du collagène VI dans le milieu interstitiel où il est associé avec d'autres types de collagène. Il semble également recouvrir les fibres de collagène (13).

1.2.1.2 Les Fibronectines

La fibronectine est une autre protéine importante de la MEC identifiée par immunohistochimie au niveau du myocarde et synthétisée par les fibroblastes cardiaques (14-16). La fibronectine est une glycoprotéine de 540 KDa située dans la MEC de la plupart des tissus dont le coeur (17). Elle existe sous forme dimérique ayant deux chaînes polypeptidiques quasi identiques liées par deux ponts disulfure. La fibronectine contient des domaines de liaison au collagène, à l'héparine et à certaines glycoprotéines (18). Suite à la transcription du gène fibronectine, l'épissage alternatif du mRNA mène à la formation de plusieurs isoformes de fibronectine présent au niveau du myocarde (19). La fibronectine joue un rôle important dans l'adhésion et la migration cellulaire, deux événements cruciaux lors de la réparation tissulaire, l'organogénèse et le remodelage cardiaque (10,20).

1.2.1.3 Protéoglycanes et élastines

Les protéoglycanes se trouvent à la surface cellulaire et dans la MEC. Elles peuvent moduler la migration et la prolifération cellulaire et participent aussi à l'organisation de la MEC (9,10). Les protéoglycanes ont été peu étudiées au niveau du cœur. La MEC présente également des fibres élastiques formées de polymères insolubles d'élastines qui donnent au cœur certaines de ses propriétés contractiles (9,10). Il a été démontré que les cœurs néonataux et les cœurs adultes hypertrophiés contiennent des quantités relativement élevées d'élastine, lorsqu'on les compare avec les cœurs adultes normaux. (9).

1.2.2 Régulation de la synthèse de la matrice extracellulaire et sa dégradation

La concentration nette de collagène et de fibronectine dans le cœur dépend de l'équilibre entre leur synthèse et leur dégradation. Toute perturbation de ces deux mécanismes aura un effet négatif sur le fonctionnement normal du cœur. Alors, quels sont les mécanismes qui influencent cet équilibre ?

Le maintien de l'équilibre entre la synthèse et de la dégradation de la MEC est possible grâce à deux classes d'enzymes : les métalloprotéinases (MMP's) et les inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMP's).

1.2.3 Métalloprotéinases et TIMP's

La MEC peut être dégradée par des enzymes catalytiques connues sous le nom des métalloprotéinases (MMP's)(8,10). Les MMP's sont une famille d'enzymes actifs en présence de zinc et de calcium(8,10). Jusqu'à présent, 9 MMP's ont été identifiées, clonées et séquencées (8,10). La classification de ces enzymes est basée sur l'affinité qu'ils ont pour leur substrat. Ils ont été classifiés en 3 groupes : 1) Les collagénases(MMP-1 et MMP-8) 2) les stomelysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) et 3) Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Ces trois groupes de MMP's agissent en synergie c'est-à-dire que certaines MMP's vont agir suite au passage de d'autres MMP's(8).

L'activité des MMP's est très bien contrôlée par des protéines inhibitrices spécifiques connues sous le nom de TIMP ou << tissue inhibitor of metalloprotease>>(8). Il existe 3 membres de cette famille : TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3. TIMP-1 a une haute affinité pour les collagénases, stomelysines et les gélatinases(8). Son expression est inductible par plusieurs facteurs dont l'Ang II et les cytokines comme TGF- β (8). Cependant, les TIMP-2 possèdent un profil d'action relativement équivalent à TIMP-1 mais contrairement à TIMP-1, son expression est constitutive (8).

Jusqu'à présent peu d'études décrivent la régulation des MMP's. Cependant, une étude a démontré que MMP-1 et MMP-2 sont coexprimées dans le cœur du rat. (21). De plus, il a été démontré que les MMP's et les

TIMP's sont exprimées au niveau du myocarde par les fibroblastes cardiaques et les cellules endothéliales (10,21).

1.3 Croissance Cellulaire

La prolifération anormale des fibroblastes cardiaques rencontrée durant le développement de la fibrose cardiaque représente un facteur important pour maintenir une concentration élevée de collagène et de fibronectine dans la MEC. Par conséquent, si on est capable de bien comprendre les voies de signalisations couplées à la croissance des fibroblastes cardiaques, l'industrie pharmaceutique sera en mesure de concevoir des molécules pharmacologiques capables d'inhiber de façon spécifique les événements critiques à la croissance cellulaire.

Vu le peu d'information sur les voies de signalisation au niveau des fibroblastes cardiaques, la prochaine section portera sur les voies de signalisations liées à la croissance cellulaire qu'on retrouve généralement dans plusieurs types cellulaires.

L'initiation des mécanismes impliqués dans la croissance cellulaire est un processus complexe. Plusieurs facteurs de croissance (PDGF, EGF, IGF), hormonales (AngII) et neurotransmetteurs (NE et E), peuvent initier ces mécanismes en se liant de façon spécifique à des récepteurs localisés au niveau de la surface cellulaire(22,23). Cette liaison activera plusieurs cascades intracellulaires qui finalement augmenteront la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire (22).

Au cours des 10 dernières années, grâce aux techniques de clonage et de séquençage, la compréhension des voies de signalisation ne cesse d'augmenter. Plusieurs voies de signalisations couplées à la croissance et à la différenciation cellulaire furent découvertes. Le recrutement de la voie MAPK et de la voie PI3-K sont deux voies qui suscitent beaucoup d'intérêt dans le domaine de la signalisation intracellulaire car ils jouent un rôle important dans la croissance cellulaire(24-29 et 31-35). Dans le but d'étudier ces deux voies dans la croissance des fibroblastes cardiaques, la prochaine section portera sur la description de ces deux voies.

1.3.1 La Voie MAPK

La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein kinase) constitue une des voies les plus étudiées dans le domaine de la signalisation due au fait qu'elle joue un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaire (25-30). Les MAPK sont une famille de protéines sérine/thréonine kinase activée par plusieurs facteurs de croissance, hormonaux, cytokines et neurotransmetteurs (25-30). L'activation de cette voie est très bien caractérisée lorsqu'activé par des facteurs de croissance liés à des récepteurs tyrosines kinase (36,37)(fig 1.2). La liaison d'un facteur de croissance à son récepteur va provoquer une dimérisation du récepteur (36,37). Cette dimérisation active la tyrosine kinase intrinsèque du récepteur provoquant une autophosphorylation du récepteur sur des résidus tyrosines

spécifiques(36,37). Ces résidus tyrosines phosphorylés recruteront un complexe protéique formé de

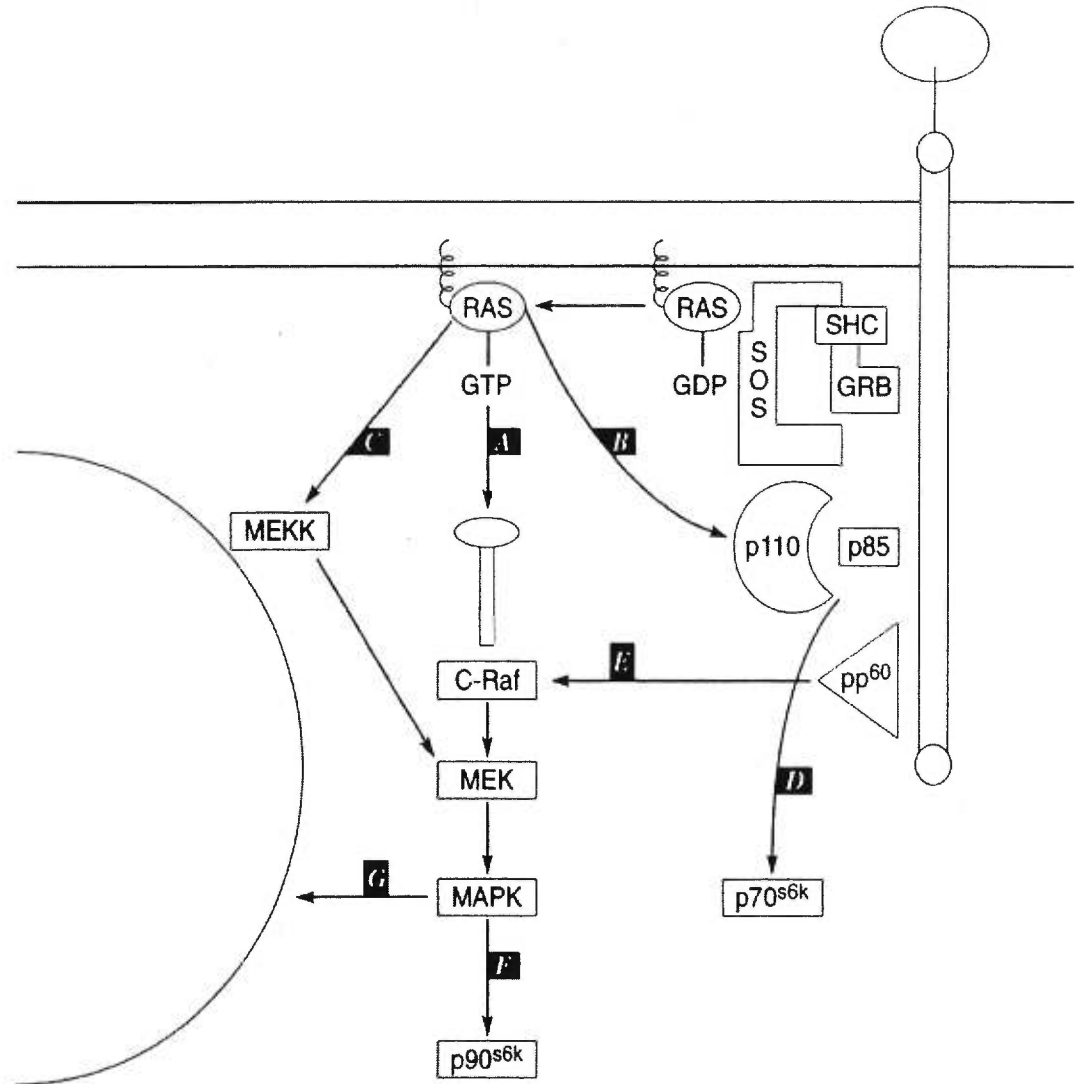


Figure 1.2 Voies couplées aux récepteurs tyrosine kinases

deux protéines : GRB2 (growth factor receptor -bound protein et SHC). Ces deux protéines ont la propriété de lier des résidus tyrosine phosphorylés grâce à leur domaine SH2 (Src homology 2)(36,37). Une fois lié de façon spécifique aux résidus tyrosines phosphorylés, le complexe GRB2/SHC recrute mSOS qui par la suite accéléreront l'échange d'un Ras-GDP pour un Ras-GTP. Ras est une petite protéine G de 21 KDa essentielle à la croissance et à la différenciation de plusieurs types cellulaires induits par des facteurs de croissance. (38-41) Ras fait partie d'une petite famille de protéines G capable de lier le GDP et le GTP(38-41).

Elle existe sous deux formes : lorsqu'elle est liée au GDP, elle est inactive et lorsqu'elle est liée au GTP, elle est sous forme active (fig 1.3). La régulation de Ras se fait par la vitesse de l'échange d'un GDP pour un GTP et l'hydrolyse du GTP en GDP + Pi (38-41). Une fois activé, Ras lié à la membrane recrute le premier membre de la famille MAPK connue sous le nom de Raf ou MAPKKK. Lorsque activé, Raf phosphoryle d'autres protéines connues sous le nom de MEK ou MAPKK provoquant ainsi leurs activations. MEK activera ensuite ERK en phosphorylant ERK (MAPK) sur des résidus thréonines et tyrosines. ERK se retrouve normalement dans le cytoplasme mais lorsque activée, des études d'immunofluorescence ont démontré sa présence dans le noyau (42). Cette translocation dans le noyau permettra à ERK de phosphoryler certains facteurs de transcription comme c-jun qui par la suite altérera l'expression des gènes (37,43).

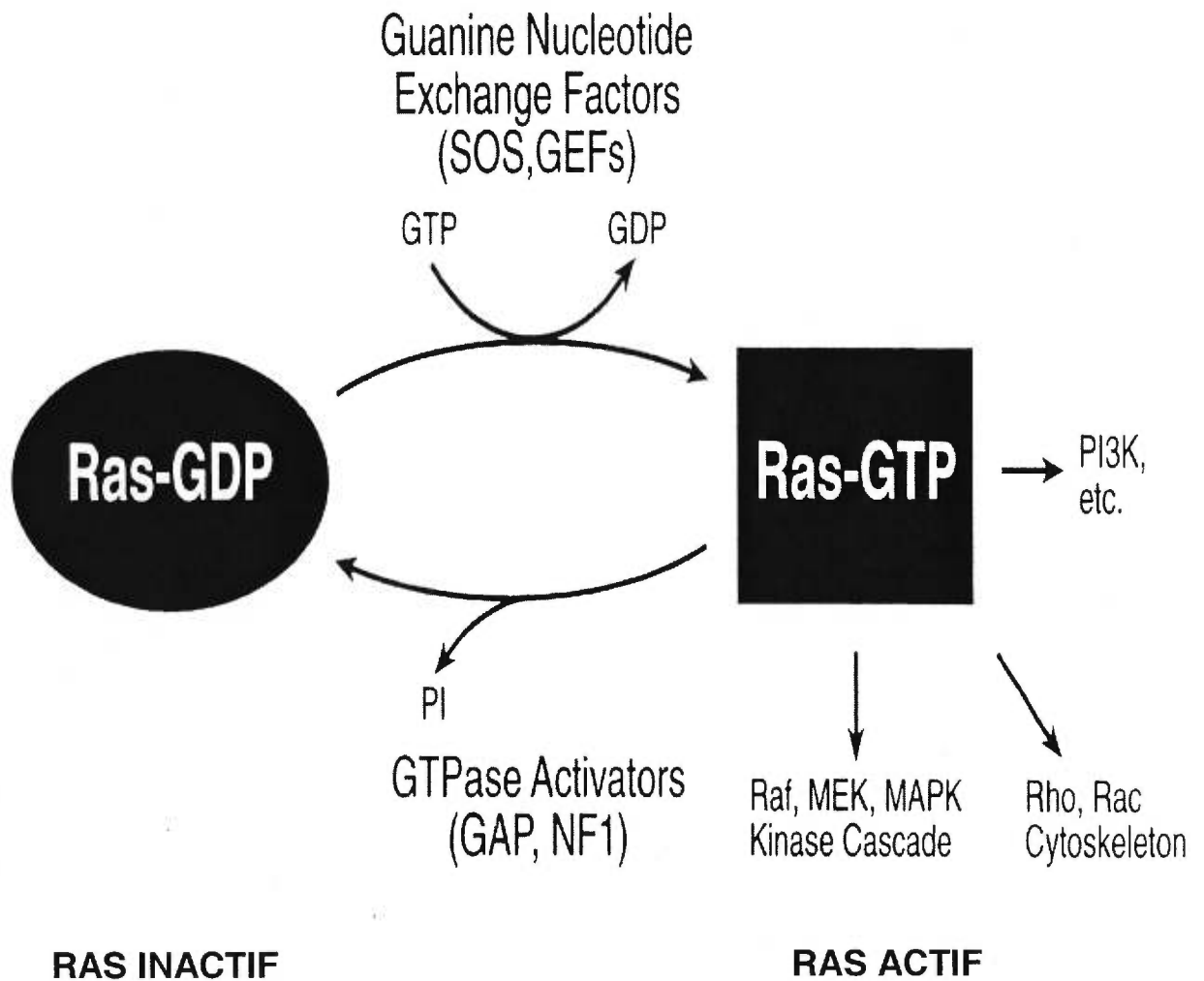


Figure 1.3 Voies de signalisations liées à ras

Contrairement au récepteur tyrosine kinase, l'activation de la voie MAPK par les récepteurs couplés aux protéines G est moins bien caractérisée que la voie Ras-Raf-MEK-ERK . Plusieurs études ont rapportée que l'activation de ERK par les GPCR est similaire à l'activation de ERK par les récepteurs tyrosine kinase (25,26,28). Ces récepteurs peuvent aussi recruter ERK par l'intermédiaire de GRB2/SHC, mSOS et Ras (25,26,28). Cependant, il existe une différence entre les récepteurs tyrosine kinase et les GPCR. Les récepteurs GPCR sont dépourvus d'une activité tyrosine kinase intrinsèque. Il leur faut donc des protéines tyrosine kinase de type non récepteur pour pouvoir recruter le complexe GRB2/SHC pour ainsi activer la voie de Ras-Raf-MEK-ERK. De façon intéressante, Hordijik et ses collaborateurs ont démontré que le prétraitement avec un inhibiteur des protéines tyrosine kinase, le génisteine, inhibe l'activation de ERK (44).

1.3.2 La voie du Phosphatidylinositol 3-Kinase

Les phosphatidylinositols (PI) sont une famille de lipides localisés dans la membrane plasmique et représentent un faible pourcentage de la bicouche plasmatique (45). Cependant, le métabolisme des PI joue un rôle important dans plusieurs processus complexes dont la prolifération et la différenciation cellulaire, la survie cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, l'apoptose et la migration cellulaire (35,46).

Il existe deux voies de signalisations impliquant les PI : 1) la voie classique impliquant la phospholipase C (PLC) et 2) la voie impliquant le

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). La voie classique implique l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-P₂ (PI4, 5P₂) en inositol 1,4, 5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Le IP₃ et DAG agissent comme second messenger en provoquant un relâchement de calcium intracellulaire à partir du réticulum sarcoplasmique et en stimulant la protéine sérine/thréonine kinase C (PKC) respectivement (31,34,35,46).

Pendant plusieurs années, la voie classique était la seule voie impliquée dans le métabolisme des PI activé par plusieurs stimuli extracellulaire. Cependant, dans les années 80, une deuxième voie impliquant le métabolisme des PI fut découverte impliquant l'enzyme PI3-K (33,35,46).

Le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) fait partie d'une famille d'enzymes impliqués dans plusieurs mécanismes intracellulaires comme dans le réarrangement du cytosquelette, le transport du glucose et récemment il a été démontré qu'elle jouait un rôle important dans la croissance cellulaire. Cette famille d'enzymes fut découverte au début des années 80 où elle fut associée avec le complexe récepteur PDGF/pmiddle t/ pp60^{c-src} (31,34). Cette famille d'enzyme catalyse l'ajout d'un phosphate en position 3 " du cycle inositol du phosphatidylinositol. (PI) (fig 1.4). PI3-K peut phosphoryler trois substrats in vitro : PI, PI4P et PI4, 5P₂ . Les produits de cette réaction PI3P, PI3,4P₂ et PI3,4,5 P₃ agiront comme seconds messagers capablent d'activer plusieurs protéines comme PKC, P70S6K et PKB/AKT (31,32,34). Cependant, in vivo, les agonistes qui stimulent PI3-K causent principalement une augmentation de PI(3,4)-P₂ et PI(3,4,5)-P₃ (34).

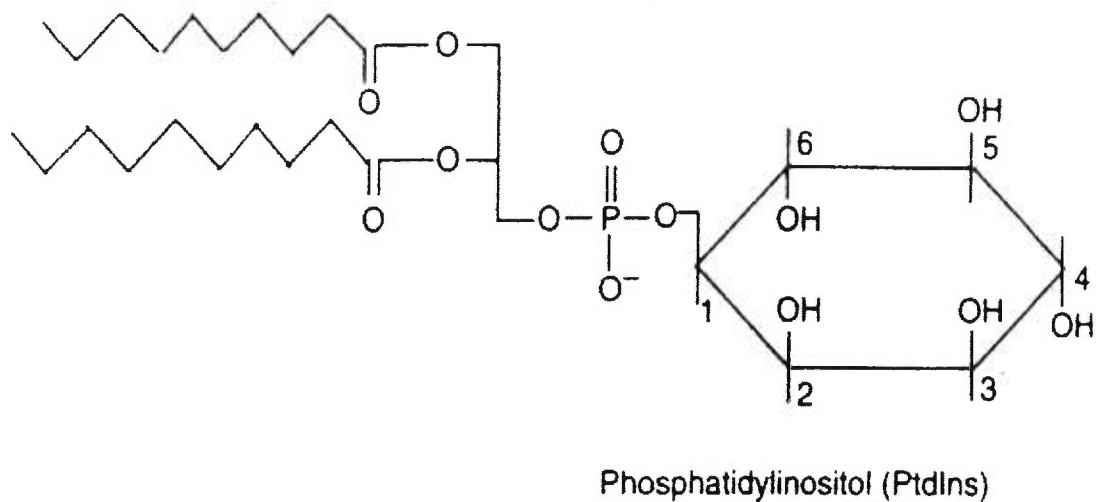


Figure 1.4 Structure du phosphatidylinositol
(Figure extrait de réf. 44)

1.3.2.1 Classification des Phosphatidylinositol 3-kinases

Il existe plusieurs classes de PI3-K basé principalement sur leur structure et sur leur mécanisme de régulation. Cette section portera sur ces différentes classes.



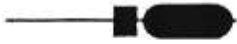
1.3.2.2 PI3-K de Classe I

Les PI3-K de classe I sont des protéines hétérodimériques qui sont composés d'une sous-unité catalytique de 110 Kda associé à une sous-unité régulatrice (31-35,47,48). Jusqu'à présent, chez les mammifères, trois types de PI3-K ont été clônés ayant 42-58% d'identité en acide aminé, qui sont désignés p110 α , p110 β et p110 δ (47,48). Chacune de ces sous-unités

contiennent un domaine de liaison à p85, un domaine phosphatidylinositol kinase(PIK) et un domaine catalytique à l'extrémité C-terminal (34,47,48). (fig 1.5). Ensemble, le produit de ces gènes et la formation d'un complexe entre une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110, représente les PI3-K de classe IA (47,48).

Les sous-unités régulatrices capables de lier les sous-unités catalytiques de la classe IA sont appelées p85 α et p85 β basé sur leur poids moléculaire (34,49). Ces sous-unités sont dépourvues d'activité catalytique mais possèdent plusieurs domaines qui sont homologues à ceux retrouvés dans d'autres protéines de signalisation (34,47,48). p85 α et p85 β contiennent un domaine SH3, deux domaines SH2, deux à trois séquences riches en proline et un domaine homologue à la protéine rho-GAP's (34,47,48). D'autres protéines adaptatrices ont été identifiées comme étant capables de se lier à la sous-unité catalytique de la classe IA (47,48). Ces protéines sont semblables à p85 mais n'ont aucun domaine SH3, pas de domaine BH et aucun domaine riche en résidus proline. Ces protéines adaptatrices sont p55 γ et p55^{PIK} qui proviennent de l'épissage alternatif de p85 α (47,48).

Outre l'activité phosphatidylinositol kinase présente dans la sous-unité catalytique de PI3-K de la classe IA, on y retrouve aussi une activité sérine/thréonine kinase intrinsèque (48). Cette activité kinase de p110 permet à celle-ci de phosphoryler la sous-unité régulatrice sur le résidu sérine 608 (68). Cette phosphorylation est en sorte un mode de régulation de l'activité phosphatidylinositol kinase de PI3-K (48).

Class	Catalytic Subunit	Schematic Representation	Substrate Specificity	Adaptor/ Binding Partner
I A	p110 α p110 β p110 δ		PtdIns, PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P ₂	p85 α p85 β p55 γ / p55 ^{PIK}
	I B	p110 γ		
II	PI3K-C2 α / mcpk /p170 PI3K-C2 β PI3K_68D /cpk		PtdIns, PtdIns(4)P, (PtdIns(4,5)P ₂)	Unknown
III	Vps34p / PtdIns 3-kinase		PtdIns	Vps15p/ p150

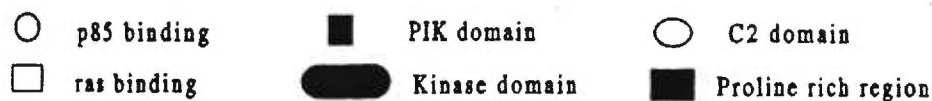


Fig. 1. The classification of PI3-kinase family members. The assignment of catalytic subunits to a particular class is based on sequence homology within the catalytic domain [5]. To date, PI3K-C2 α is the only class II member which has been shown to phosphorylate PtdIns(4,5)P₂.

Figure 1.5 Classification des membres de la famille PI3-K
(Figure extrait de réf.49)

1.3.2.2 PI3-K de classe IB

Il existe une autre classe de PI3-K ayant 36% d'homologie avec la sous-unité catalytique p110 α et connue sous p110 γ (47,48). Cette sous-unité fut découverte dans les plaquettes et les neutrophiles lorsque activés par les protéines G, plus spécifiquement les sous-unités G $\beta\gamma$ (47,48). Cette classe de PI3-K contient aussi un domaine PIK et un domaine de liaison à ras (47,48). Cependant, p110 γ ne contient aucun domaine de liaison à p85 situé à l'extrémité N-terminale (47,48). Cette classe de PI3-K fait partie de la classe IB. Malgré cette différence entre la classe IA et IB, p110 γ peut aussi se lier à une protéine adaptatrice connue sous le nom de p101. La liaison de p101 à p110 γ rend ce complexe beaucoup plus sensible à son recrutement par les sous-unités G $\beta\gamma$ (47,48).

1.3.2.3 PI3-K de Classe II

Les PI3-K de cette classe, contiennent les sous-unités catalytiques les plus large (170-210 KDa). Ils contiennent aussi un domaine PIK dont le domaine catalytique a 45-50% de similarité avec les PI3-K de la classe I et un domaine C2 à l'extrémité C-terminale (47,48). Ce domaine semble important pour les interactions calcium-dépendant de certaines protéines à des vésicules lipidiques.

1.3.2.5 PI3-K de Classe III

Cette classe de PI3-K fut découverte chez la levure suite au clonage de la sous-unité catalytique p110 chez les mammifères (47,48). Elle est connue sous Vps34p et elle a comme substrat que le phosphatidylinositol(PI). Bref, peu d'études ont été entreprises sur cette classe d'enzyme.

1.3.3 Les effecteurs de PI3-K

La stimulation de PI3-K mène principalement à la génération de Ptlns-3,4-P₂ et le Ptlns-3,4,5-P₃ (48). L'accumulation de ces seconds messagers strictement localisés à la membrane plasmique, permettent de recruter de façon directe ou indirecte plusieurs protéines kinases tel que Akt/PKB, p70S6K et PKC-ζ (47,50,51).

La protéine kinase Akt/PKB est une sérine/thréonine kinase qui a la propriété de lier spécifiquement le Ptlns-3,4,5-P₃ grâce à son domaine PH(Pleckstrin Homology (47,50,51). Chez les mammifères, il existe trois isoformes de PKB : PKB α , PKB β et PKB γ . PKB β et PKB γ et ils ont environ 82% d'identité avec l'isoforme α , malgré 23 acides aminés en moins de l'isoforme γ (50). Au niveau du cœur, on y retrouve principalement les isoformes α et β .

Les premières études qui ont démontrés que l'activation de PKB était PI3-K dépendante ont été basées principalement sur deux observations : 1) l'activation de PKB via les facteurs de croissance a été inhibée par le

wortmannin et 2) la mutation à des points spécifiques du récepteur de facteurs de croissance qui inhibe l'activation de PI3-K, a aussi inhibé l'activation de PKB (50). L'activation de PKB se fait dans un premier temps par son recrutement au niveau de la membrane plasmique qui est possible par l'intermédiaire des phosphatidylinositols phosphorylés par PI3-K (47,50-52). Une fois à la membrane plasmique, PKB est phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine spécifiques, par une protéine kinase Ptlns-3,4,5- P_3 -dépendant 1(PDK-1) (47,50-52). L'activation de PKB est impliquée dans plusieurs processus biologiques, tels que la synthèse du glycogène, la synthèse protéique et le transport du glucose.

Une autre cible de PI3-K est la p70 S6 kinase (p70S6K), qui est une protéine sérine/thréonine kinase activée indirectement par PI3-K via l'intermédiaire de PKB (52). Il a été démontré que l'activation de p70S6K joue un rôle de régulation dans la synthèse protéique et dans la synthèse d'ADN (52). Son activation se fait par la phosphorylation à plusieurs sites, sur des résidus sérine et thréonine (52).

Finalement, la protéine kinase C- ζ (PKC- ζ) fait partie de la famille PKC atypiques qui sont insensibles au DAG (diacylglycérol). Cet isoforme est activé directement par les produits de PI3-K et pourrait servir d'intermédiaire dans l'activation de p70S6K (52). Plusieurs observations semblent suggérer que l'activation de PKC- ζ par PI3-K est nécessaire dans plusieurs réponses cellulaires, particulièrement dans la mitogénèse et la synthèse protéique (51).

1.3.4 Angiotensine II et la voie de PI3-K

PI3-K est une protéine hétérodimérique qui catalyse l'ajout d'un groupement phosphate en position D-3 du cycle inositol des phosphatidylinositols (31,32,47,48,51). Les produits de cette réaction agissent comme second messenger pour ainsi activer plusieurs mécanismes intracellulaires dont la croissance cellulaire (32,35,45). Depuis sa découverte, l'activation de PI3-K fut souvent associée aux récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (31,34). Cependant, de plus en plus d'études démontrent que son activation peut être médiée par les récepteurs couplés aux protéines G (31,34). Récemment, un groupe de chercheurs a démontré que le traitement avec AngII in vitro et in vivo, augmente l'activité de PI3-K au niveau des cellules vasculaires de muscle lisse(CVML)(33). De plus, ils ont démontré que le pré-traitement des CVML avec le LY294002, un inhibiteur spécifique de la sous-unité catalytique de PI3-K (53), a inhibé l'augmentation de la synthèse d'ADN, d'ARN et de l'hyperplasie observé au niveau des CVML (33). Ces résultats confirment le rôle important de PI3-K dans la croissance cellulaire médié par l'AngII.

Au niveau des fibroblastes cardiaques, le rôle de PI3-K dans la croissance cellulaire demeure à ce jour inconnu. Cependant, David E.Dostal et ses collaborateurs semblent suggérer que PI3-K pourrait être un effecteur pontentiel de ras recruté par AngII au niveau des fibroblastes cardiaques

(54). Ceci dit, ce mémoire explorera le rôle de PI3-K dans la croissance des fibroblastes cardiaques de rats nouveaux nés.

1.4 Facteurs impliqués dans la croissance des fibroblastes cardiaques

Les fibroblastes cardiaques représentent les deux tiers de la population cardiaque. Leur rôle dans le remodelage cardiaque fut sous-estimé. Aujourd'hui, on sait que les fibroblastes cardiaques jouent un rôle prédominant dans le développement de la fibrose cardiaque. De plus, la fibrose est un facteur important dans le développement de l'insuffisance cardiaque (4). Il est donc important de bien comprendre les voies de signalisation couplées à l'AngII et au système nerveux sympathique, deux facteurs capables de stimuler la croissance des fibroblastes cardiaques, pour ainsi développer des molécules pharmacologiques capables d'inhiber de façon spécifique des événements critiques à la croissance des fibroblastes cardiaques.

1.4.1 Le système rénine-angiotensine

L'angiotensine II (Ang II) a été identifiée il y a plus de 50 ans par Braun-Menedez et al. et Page Helmer(55,56). Le précurseur d'Ang II est l'angiotensinogène qui est clivé par une protéase, la rénine pour ainsi devenir l'angiotensine I (Ang I)(57,58). Par la suite, Ang I devient Ang II par l'action d'une enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour ainsi devenir un peptide biologiquement actif, l'angiotensine II (57,58)(fig 1.6).



Figure 1.6

L'Ang II est une hormone peptidique qui exerce une multitude d'actions biologiques au niveau du système cardio-vasculaire (57,58). Elle exerce une action vasoconstrictrice sur l'ensemble du réseau vasculaire, tant périphérique que coronaire, contrôlant ainsi la pression artérielle (57,58). Elle contribue aussi à la régulation de certaines fonctions cellulaires périphériques, comme la réabsorption rénale de sodium (57,58). Outre ses effets classiques, Ang II stimule la croissance de plusieurs types cellulaires, notamment celles des myocytes et des fibroblastes cardiaques (33,57,59-61).

Les effets de l'Ang II sur le système cardio-vasculaire sont médiés par des récepteurs membranaires spécifiques (57). Il existe deux types de récepteurs à Ang II, les récepteurs AT₁ et AT₂ (57). Ces récepteurs font partie des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et ils sont couplés aux protéines G (57). La liaison d'Ang II à ses récepteurs active plusieurs voies de signalisation qui stimulent plusieurs protéines et enzymes qui interagissent entre eux pour ainsi initier la synthèse d'ADN et la synthèse de protéines (57). La composition de ces voies de signalisation au niveau des fibroblastes cardiaques est partiellement connue et ils feront l'objet de cette revue dans la section 1.4.3.

1.4.2 Angiotensine II et la fibrose cardiaque

Plusieurs évidences cliniques et expérimentales ont démontré que l'AngII joue un rôle important dans le développement de la fibrose cardiaque (4). 1) Jalil et Weber ont démontré à l'aide d'un modèle de rat avec une hypertension rénovasculaire que l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le captopril, inhibait non seulement la synthèse d'ADN mais aussi le dépôt de collagène dans le milieu interstitiel du myocarde. 2) Il a été démontré que l'Ang II augmente la synthèse de collagène dans les fibroblastes cardiaques, dans un modèle in vitro (62). 3) Ang II augmente la synthèse de certaines cytokines (TGF- β 1 et β 3) et de l'endothéline qui elle influence la croissance des fibroblastes cardiaques (63,64). Ces études démontrent l'importance du système rénine-angiotensine dans le développement de la fibrose cardiaque. Malgré plusieurs évidences de l'implication de l'Ang II dans le développement de la fibrose, les voies de signalisation associées à la croissance demeurent mal caractérisées.

Depuis ces études, plusieurs études biochimiques et de biologie moléculaire ont été entreprises pour caractériser les effets de l'Ang II sur la croissance des fibroblastes cardiaques.

1.4.3 Effet d'Angiotensine II sur la croissance des fibroblastes cardiaques

Au niveau des fibroblastes cardiaques, l'AngII a été démontrée de stimuler la synthèse d'ADN, la synthèse d'ARNm et la synthèse protéique. De plus, l'AngII stimule aussi la synthèse de facteurs autocrine et paracrine comme TGF et endothéline capables d'influencer la croissance des fibroblastes cardiaques (65).

On retrouve au niveau des fibroblastes cardiaques principalement les récepteurs AT1. Pour ce qui est des récepteurs AT2, ils subissent tôt après la naissance, une régulation à la baisse peu après la naissance (66). De façon intéressante, des études à l'aide d'antagonistes des récepteurs AT1 et AT2 ont démontrés que les effets mitogéniques de l'AngII sont médiés par les récepteurs AT1(22). Le rôle des récepteurs AT2 est encore sous investigation. Toutefois, une étude récente menée par Tsutsumi et al., a démontré que l'ARNm des récepteurs AT2 est augmenté chez les patients souffrant d'une cardiomyopathie dilatée (67). De façon intéressante, l'expression de ces récepteurs était aussi associée à une augmentation de l'expression des gènes qui codent pour des protéines faisant partie de la matrice extracellulaire et que les fibroblastes cardiaques étaient le lieu de synthèse des récepteurs AT2 (67). Malgré cette expression à la hausse des récepteurs AT2, le rôle exact de ces récepteurs demeure sous investigation et des études futures utilisant des antagonistes des récepteurs AT2 seront utiles afin de déterminer leurs rôles dans les cardiomyopathies dilatées (68).

La liaison d'AngII active plusieurs voies de signalisation par l'intermédiaire de Gi/Gq (22,54). Dans plusieurs types cellulaires, notamment au niveau des fibroblastes cardiaques, l'AngII active la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de Gq, pour ainsi générer deux seconds messagers : l'inositol 1,4, 5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). Le IP3 stimule la libération de calcium (Ca^{2+}) à partir de compartiments intracellulaires et le DAG activera une famille de protéine kinase C (PKC) (22,54). Outre la libération de Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de PKC, AngII peut aussi recruter le proto-oncogène Ras, la protéine kinase ERK et PI3-K.

1.5 Le système sympathique

Le système nerveux sympathique (SNS) est activé par plusieurs facteurs : anxiété, excitation, exercice et bien d'autres. De plus, il est activé dans plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, pour ainsi maintenir le système cardiovasculaire fonctionnel (69). L'activation du SNS mènera au relâchement de catécholamines dans la circulation sanguine par la médullosurrénale et dans les jonctions neuromusculaires cardiaques (69). Ces catécholamines iront par la suite agir sur des récepteurs adrénergiques augmentant ainsi la vasoconstriction des vaisseaux sanguins périphériques et la fréquence cardiaque (69).

Les récepteurs adrénergiques sont des récepteurs à sept passages transmembranaires. Il existe deux familles de récepteurs adrénergiques : les récepteurs α -adrénergique et β -adrénergique (70). Chacune de ces familles

contient divers sous-types de récepteurs(70). Les récepteurs α -adrénergiques sont divisés en sous-types α_1 et α_2 et les récepteurs β -adrénergiques en β_1 et β_2 (70). La liaison des catécholamines sur chacun de ces récepteurs aura des effets distincts sur le système cardio-vasculaire(70). Les effets reliés aux récepteurs α -adrénergiques sont principalement situés au niveau du lit vasculaire et au niveau des cardiomyocytes, tandis que les effets reliés aux récepteurs β -adrénergiques sont principalement localisés au niveau du myocarde (70).

Toutefois, le rôle des catécholamines ne se limite pas à la régulation de la pression artérielle, elle peut aussi influencer la croissance des cellules cardiaques. Au début des années 80, Simpson et collaborateurs ont montré que la norépinéphrine (NE) pouvait stimuler l'hypertrophie des cardiomyocytes via les récepteurs α_1 adrénergiques (71). Au niveau des fibroblastes cardiaques, la NE stimule leur prolifération via les récepteurs β_2 -adrénergiques. Malgré ces connaissances, peu d'études ont été entamées sur les voies de signalisation couplées aux récepteurs adrénergiques. Dans la section 1.5.2, il sera question des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_2 -adrénergiques.

1.5.1 Le système nerveux sympathique et la fibrose cardiaque

Il existe quelques évidences in vivo et in vitro qui démontrent l'implication du SNS dans le développement de la fibrose cardiaque. Weber et collaborateurs ont démontré que l'isoprotérénol, un agoniste β_2 -adrénergique, administré à une concentration de 1mg/kg chez le rat, induisait le développement de la fibrose au niveau du myocarde. De façon intéressante, une étude in vitro a démontré que le traitement avec ISO stimule non seulement la prolifération des fibroblastes cardiaques mais augmente aussi l'expression du mRNA du gène de collagène, supportant ainsi un rôle important du SNS dans l'induction de la fibrose cardiaque (72).

1.5.2 Voies de signalisation couplées aux récepteurs β_2 -adrénergiques

La production de l'AMPc constitue le second messenger le plus important impliqué dans la réponse physiologique couplée au récepteur β -adrénergique (73). Au niveau de la croissance cellulaire, une augmentation de l'AMPc intracellulaire a été démontrée d'être un facteur anti-prolifératif dans plusieurs types de cellules (74-76). Dans les fibroblastes cardiaques, la stimulation des récepteurs β -adrénergique a provoqué une augmentation de la synthèse d'ADN malgré l'augmentation de l'AMPc (72). Ces résultats suggèrent que les récepteurs β -adrénergique peuvent recruter des voies prolifératives qui sont insensibles à l'effet de l'AMPc. Récemment, il a été démontré que la stimulation des récepteurs β -adrénergiques est reliée à

l'activation de ERK via une voie de l'AMPc indépendante (77). Donc, dans les fibroblastes cardiaques, la stimulation de la croissance par les agonistes β_2 -adrénergique pourrait être couplée à des voies tyrosine kinases insensibles à l'AMPc.

1.6 Objectifs de cet mémoire

Tel que discuté auparavant, la croissance des fibroblastes cardiaques et le dépôt de protéines faisant partie de la matrice extracellulaire dans le milieu interstitiel, demeure deux événements nécessaires au développement de la fibrose cardiaque. Par conséquent, la conception de composés pharmacologiques capables d'inhiber les voies de signalisation reliées à ces événements, représente une approche thérapeutique très intéressante pour prévenir ou limiter le développement de la fibrose cardiaque.

Dans cette étude nous allons répondre aux questions suivantes :

- 1- Comment les récepteurs β -adrénergiques stimulent la synthèse d'ADN?
- 2- Est-ce que les voies de signalisation liées à la croissance cellulaire, stimulée par différents agonistes (Angiotensine II vs Isoprotérénol), se fait par des événements en commun ou distincts?

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

2.1 Culture des fibroblastes cardiaques de rats nouveaux-nés

Les fibroblastes cardiaques ont été isolés à partir de rats nouveaux-nés Sprague-Dawley âgés de un à trois jours et achetés chez Charles-River Canada(St-Constant, Québec), comme décrit auparavant(78).

Au niveau du cœur, on retrouve principalement deux types cellulaires : les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques. La technique décrite par Calderone et collaborateurs permet de séparer les fibroblastes des myocytes(78). Une fois les cœurs enlevés des animaux, les ventricules sont séparés des oreillettes, ensuite découpés et digérés avec une solution de trypsine 0.1%(GIBCO BRL) pendant la nuit à 4°C. Suite à cette digestion, les tissus sont encore soumis à plusieurs digestions à l'aide d'une solution de collagénase 0.1%(GIBCO BRL). (Chacune de ces incubations permet de briser les fibres de collagène qui permettra de libérer les myocytes et les fibroblastes.) Après chacune de ces digestions, les suspensions cellulaires ont été collectées et centrifugée à 1000 g à 4°C. Les culots cellulaires sont ensuite resuspendus dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)enrichi de sérum FBS 7% (Fetal Bovine Serum). Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 min dans des flacons T75 à deux reprises(ces étapes permettent de séparer les fibroblastes des cardiomyocytes car les fibroblastes s'attachent au fond du flacon plus rapidement que les myocytes). Après l'incubation de 45 min, les fibroblastes ont adhéré au fond du flacon et les myocytes en suspensions sont retirés et

cultivés dans du DMEM enrichi de FBS 7% . Les fibroblastes cardiaques sont placés dans du DMEM enrichi de FBS 7% jusqu'à confluence. Une fois confluents, les fibroblastes cardiaques sont séparés des autres lignées cellulaires avec une solution de trypsine 0.25%(GIBCO BRL). Les cellules sont ensuite placées dans des pétris de 100mm à une densité de 100 cellules/mm², dans un milieu DMEM enrichi de FBS 7%. Après 48h d'incubation, le milieu est aspiré, les cellules sont lavées avec un tampon phosphate salin(PBS pH 7,4 à 4°C) et placées dans un milieu DMEM contenant 5 µg/ml d'insuline, 5 µg/ml de transférine et 5 ng/ml de sélénite de sodium(Collaborative Biomedical; Bedford, MA) pendant 48h précédant le protocole expérimentale.

2.2 Mesure de la synthèse d'ADN et de la synthèse protéique à l'aide de [³H]- thymidine et [³H]-leucine

Les fibroblastes cardiaques sont traités 24 h avec soit l'Isoprotérénol (1µmole/L;Sigma; St-Louis, MI), angiotensine II (1µmole/L;Sigma), forskoline (20 µmole/L;Sigma), le 8-bromo-cyclic AMP (1mmole/L;Sigma), la toxine de choléra (100 ng/ml; Sigma), ou le phorbol 12,13-dibutyrate (500 nmole/L; Calbiochem; LaJolla, CA). La mesure de la synthèse d'ADN est possible grâce à l'addition de 2 µCi/ml de [³H]-thymidine (ICN Biomedicals Inc.; Costa Mesa,CA) pour une période de 4-6 h précédant la période de traitement et pour la synthèse protéique, l'ajout de 2 µCi/ml de [³H]-leucine (ICN Biomedicals Inc) est nécessaire. Soit 20 µmole/L de génistéine (Calbiochem),

20 $\mu\text{mole/L}$ tyrphostine A25(Calbiochem), ou l'analogue inactif A1 de la tyrphostine est additionné 1 h avant l'ajout de de l'Isoprotérénol. La toxine de Pertussis(100 ng/ml; Sigma), ou l'inhibiteur de la farnesyltransférase BMS-191563(50 $\mu\text{mole/L}$; Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), est ajouté 24 h avant l'addition de l'isoprotérénol ou l'angiotensine II. L'inhibiteur de MEK1/2, le PD098059(50 $\mu\text{mole/L}$; Biomol; Plymouth Meeting, PA) (79), l'inhibiteur de PI3-K, le LY294002 (10 $\mu\text{mole/L}$; Biomol (53), ou l'inhibiteur de p70/p85^{S6K}, le rapamycine (10 nmole/L; Biomole (80), sont additionnés 30-60 min avant l'ajout de soit l'isoprotérénol ou l'angiotensine II. Suite au protocole expérimental, les fibroblastes cardiaques ont été lavés deux fois avec du PBS froid(ph= 7,4), et 1 ml d'acide trichloroacétique 5% froid(Sigma) fut ajouté, puis incubé pendant 30 min pour précipiter l'ADN et les protéines. Les lysats protéiques ont ensuite été lavés deux fois avec de l'eau froide, puis solubilisés dans 0.4 M de NaOH. Les aliquots ont été comptés dans un compteur à scintillation β Beckman. L'activité de base est considéré comme étant la l'incorporation de thymidine ou de leucine qu'on observe dans les cellules quiescentes. Les résultats obtenus seront en CPM et les graphiques qui résultes de ces données seront exprimés en pourcentage de changement versus basal.

2.3 Mesure de la concentration de l'AMPc intracellulaire et de l'inositol phosphate

Les fibroblastes cardiaques ont été pré-traités avec 0.5 mmole/L d'isobutylméthylxanthine (Sigma) pendant 15 min avant l'addition de l'isoprotérénol(1 μ mole/L) ou la Forskoline(10 μ mole/L), pour ensuite être incubé pendant 30 min à 37°C. Après l'incubation de 30 min, la réaction fut arrêtée avec 0.1M de HCL et les pétris furent placés sur la glace pendant 30 min. Par la suite, le surnageant fut collecté et titré à pH 7,4 avec du sodium acétate 2.5 M pH 5.8 et du NaOH 5 M. Les niveaux d'AMPc ont été quantifiés avec le kit standard RIA(Biomédical Technologies Inc., Stoughton, MA). Une fois titré, du NaOH 0.2 M fut additionné dans chaque pétri, puis incubé pendant 30 min et le contenu protéique fut mesuré par la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories Canada LTD; Mississauga, Ontario), en utilisant le BSA comme standard. Les niveaux d'inositol phosphate ont été mesurés comme mentionné précédemment (81). Les résultats sont exprimés comme étant un ratio de l'ensemble total de l'inositol phosphate tritié sur l'ensemble total des lipides phosphatidylinositols tritiés.

2.4 Immunofluorescence de ras

Les fibroblastes cardiaques ont été placés sur des lamelles circulaires dans des plateaux contenant 6 puits. Ensuite ils ont été fixés 10 min avec du PBS(pH 7,4)-paraformaldéhyde 4%, puis incubés pendant 10 min avec du NH₄Cl 50 mmole/L. Une fois les cellules fixées, ils ont été perméabilisés avec

du triton X-100/PBS 1% pendant 5 min, puis lavés avec du PBS et traités avec du PBS-BSA 2% pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 h à la température de la pièce ou 24 h à 4°C avec un anticorps monoclonal de rat anti-ras (Dilution :1 :25 dans du PBS-BSA 2%), qui reconnaît les isoformes H-ras, N-ras et K-ras(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS, traitées pendant 30 min avec du PBS-BSA 2% et incubées pendant 1 h avec un anticorps de chèvre anti-rat IgG qui est conjugué avec du fluorescein isothiocyanate (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1 :100 dans PBS-BSA 2%. Suite à l'incubation, les fibroblastes sont lavés avec du PBS et les lamelles de verre sont placée avec une solution(50% glycérol) contenant du n-propylgallate pH 8. Les cellules ont été ensuite observées sous un objectif 1.3 40X (Microscope Nikon Optiphot-2 microscope) et photographiées avec un film Kodak T-Max 400 exposé à 1600 ASA.

2.5 Mesure de l'activité de ERK et de PI3-K

Une fois le protocole expérimental terminé, les fibroblastes cardiaques sont lavés deux fois avec du PBS (pH 7,4, 4°C), puis lysés avec un tampon de lyse contenant du TRIS 10 mmole/L pH 7,5 , NaCl 150 mmole/L, EDTA 1mmole/L, EGTA 1mmole/L, NaF 50 mmole/L, β -glycérophosphate 20 mmole/L, phénylméthylsulfonyl fluoride(PMSF) 0.5 mmole/L, sodium vanadate 1 mmole/L, triton X-100 1% , nonidet P-40 0.5%, 1 μ g /ml de leupeptine, et 1 μ g/ml d'aprotinine. La concentration des protéines a été mesurée par la

méthode de Bradford. L'activité de ERK fut mesurée par la technique d'immunoprécipitation. 100 µg de lysat cellulaire ont été incubés pour une période de 4 h à 4°C en présence des anticorps de chèvre polyclonale dirigés contre ERK-1 et ERK-2(1 :300; Santa Cruz Biotechnology). Les complexes immuns ont été recueillis en incubant les échantillons pendant 90 min avec des billes d'agarose A/G(Santa Cruz Biotechnology), puis centrifugés. Les culots obtenus ont été lavés deux fois avec le tampon de lyse, deux fois avec le tampon kinase(HEPES 50 mmole/L, MgCl₂, pH 7,4). Les complexes immuns furent ensuite placés dans 50 µl de tampon kinase contenant 2 µCi de [γ -³²P]-ATP(Amersham Canada Limited; Oakville, Ontario), 10 µmole/L d'ATP non marqué, 0.2 mg/ml de MBP(myelin basic protein)(Sigma) et incubés à 30°C, pendant 30 min. La réaction fut ensuite arrêtée avec l'addition de 20 µl de EDTA 200 mmole/L pH 7, et 20 µl d'échantillon fut retiré et placé sur des carrés de 1.5 × 1.5 cm de papier Whatman P-81 qui ont été immédiatement lavés 4 fois dans une solution d'H₃PO₄ 75 mmole/L et une fois avec de l'acétone. Une fois les lavages terminés, la radioactivité incorporée a été mesurée dans un compteur à scintillation β (Beckman). Une autre technique utilisée pour étudier l'activité de ERK fut d'additionnée du tampon d'échantillonnage Laemmli 3X SDS à 25 µl d'échantillon. Les échantillons ont ensuite été bouillis pendant 5 min, puis séparés par gel d'électrophorèse SDS-10% polyacrylamide pour ainsi visualiser le MBP phosphorylé par autoradiographie.

L'activité de PI3-K fut déterminée selon la technique décrits par Pandey et collègue (82), avec quelques modifications mineures. Les lysats des fibroblastes (300-400 μg de protéines) ont été immunoprécipitées avec un anticorps dirigé contre p85 α (dilution 1 :100; qui reconnaît aussi les sous-unités p85 β , et p55; Santa Cruz Biotechnology) pendant 3-4 h à 4°C. Les complexes immuns ont été recueillis par l'addition d'agarose A/G, puis les culots ont été lavés trois fois avec une solution HNTG(20 mM de HEPES pH 7.5, Glycérol 10%, Triton 0.1%, 150mM de NaCl, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'aprotinine, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptine et 1 mM de PMSF), une fois avec du PBS froid, une fois avec une solution 0.5M LiCl/ 0.1 M TRIS pH 7,5, une fois avec de l'eau froide et une fois avec 0.1M NaCl/ 1mM EDTA/ 20 mM TRIS pH 7,5. Une fois les lavages terminés, les culots sont resuspendus dans 50 μl de tampon kinase(20 mM TRIS pH 7,5, 100mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 20 mM MgCl_2), contenant 0.5 mg/ml de phosphatidylinositol(Sigma), 10 μM d'ATP, et 1 μCi de [γ - ^{32}P]-ATP. La réaction fut ensuite incubée pendant 30 min à la température pièce, puis arrêtée avec l'addition de 150 μl de HCL : CH_3OH : CHCl_3 (2 :200 :100). Une fois la réaction terminée les phospholipides sont extraits avec 100 μl de CHCl_3 . Les phosphatidylinositols phosphorylés en position 3 " sont ensuite résolus par chromatographie sur couche mince de silica (TLC) dans une chambre de verre contenant CHCl_3 : MeOH : $\text{NH}_4\text{OH}(28\%)$: H_2O (76 :86 :10 :14).

2.6 Analyse par Immuno-buvardage des résidus tyrosine phosphorylés de ERK

ERK fut immunoprécipité comme décrit ci-haut. Suite aux lavages des complexes-immuns, 10 μ l de tampon d'échantillonnage Laemmli 3X SDS ont été ajoutés à 20 μ l d'échantillon, puis les échantillons ont été bouillis pendant 5 min, séparés par gel d'électrophorèse SDS-10% polyacrylamide. Après transfert sur une membrane nitrocellulose (Hybond-C, Amersham Canada limited), la membrane a été incubée avec 10 mM TRIS pH 7,4, 150 mM NaCl, BSA 3%, et du tween 0.1%(v/v) pendant 1 h. Par la suite, la membrane est incubée pendant 4 h à la température pièce ,avec un anticorps de souris contre les résidus phosphotyrosines (Dilution 1 :1000; Santa Cruz Biotechnology), puis lavée quatre fois avec 10 mM TRIS pH 7.4/150 mM NaCl/ 0.5% Nonidet P-40 (Tampon TNN) et incubée une autre fois avec un deuxième anticorps conjugué à la peroxydase Horseradish(1 :2000; GIBCO BRL), pendant 1 h à la température de la pièce. Finalement, la membrane a été lavée quatre fois avec le tampon TNN, et les bandes ont été détectées par autoradiographie en utilisant le kit de détection ECL(Amersham Canada Limited).

Chapitre 3

Résultats

Première partie

3.1 Isoprotérénol stimule la synthèse d'ADN dans les fibroblastes cardiaques de rats néonataux Via le recrutement de p21^{ras} et le phosphatidylinositol 3-kinase

3.1.1 Isoprotérénol(ISO) stimule la synthèse d'ADN via une voie AMPc-indépendante

Dans le but de vérifier l'effet d'ISO sur la croissance des fibroblastes cardiaques, les cellules ont été traitées avec ISO(1 μ mole/L) pendant 24 h causant une augmentation significative de l'incorporation de [³H]-thymidine (205 \pm 15%; n=7 ;p<0.001 vs contrôle) (Figure 3.1A). Le traitement des fibroblastes cardiaques pendant 30 min avec ISO (1 μ mole/L), ou la forskoline (10 μ mole/L), un activateur direct de l'adénylate cyclase, a augmenté la concentration d'AMPc intracellulaire, respectivement de 9-, et 6-fois (Figure 3.1B). Cependant, un traitement de 24 h avec soit la forskoline (10 μ mole/L) ou l'analogue de l'AMPc , le 8-bromo-AMPc (1 mmole/L), a diminué significativement l'incorporation de la [³H]-thymidine(n=5). De façon intéressante, le traitement avec la toxine de choléra(100ng/ml), un agent qui permet d'activer l'adénylate cyclase de façon constitutive via G_s, a diminué l'incorporation de [³H]-thymidine basal de 53 \pm 3%(p<0.001 vs contrôle;n=4).

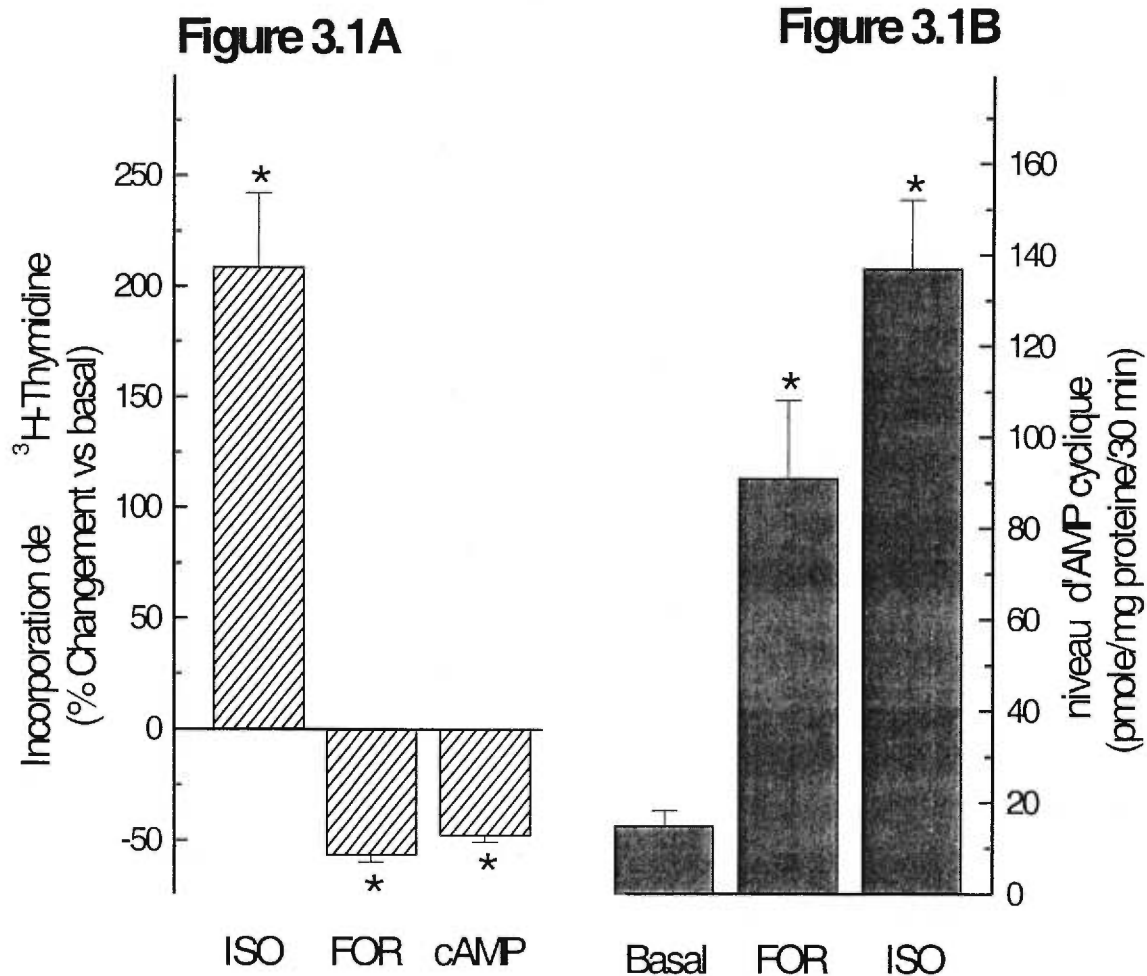


Figure 3.1A et 3.1B: Isoprotérénol (ISO) stimule la synthèse d'ADN, malgré l'augmentation de l'AMPc. Les cellules ont été traitées 30 min avec soit ISO (1 μM), FOR (10 μM) ou le 8-bromo-AMPc (1mM). Ensuite, on a déterminée le niveau d'incorporation de ^3H -Thymidine en (A) et en (B) la quantité d'AMPc produit après stimulation avec ISO et FOR.

3.1.2 Les événements couplés aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ ne sont pas couplés à la synthèse d'ADN médié par ISO

Quelques études ont démontré que les récepteurs β_2 -adrénergiques peuvent aussi être couplés à G_i et G_q (83,84). Le pré-traitement des fibroblastes avec 100ng/ml de toxine de Pertussis(TP) qui rend la sous-unité $G\alpha_i$ inactive, n'a eu aucun effet sur l'incorporation de [3 H]-thymidine stimulée par ISO (ISO=186 \pm 35% versus ISO + TP=205 \pm 67%; $p=0.81$; $n=4$). Il existe un événement en commun couplés aux récepteurs liés à $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ impliquant la phospholipase $C\beta$, qui mène à la production de IP_3 et DAG (85). Le traitement avec ISO(1 μ mole/L) pendant 30 min n'a eu aucun effet sur la concentration total d' IP_3 (0.061 \pm 0.02; $n=4$) observé au niveau basal(0.070 \pm 0.01; $n=6$). Cependant, le traitement avec l'angiotensine II (1 μ mole/L) qui est aussi couplé aux récepteurs liés à $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ pendant 30 min a provoqué une augmentation significative de la concentration totale d' IP_3 (0.234 \pm 0.02; $p<0.01$; $n=6$). Finalement, un traitement de 24 h avec le puissant activateur de la PKC, le PdBu(500 nmole/L), a causé une baisse de l'incorporation de [3 H]-thymidine basal au niveau des fibroblastes cardiaques(56 \pm 10%; $p<0.01$; $n=7$).

3.1.4 La synthèse d'ADN stimulée par ISO est reliée à des événements tyrosine kinases dépendentes

Les fibroblastes cardiaques ont été pré-traités avec deux inhibiteurs des tyrosines kinases, le génistéine (20 $\mu\text{mole/L}$) et le tyrphostine A25 (20 $\mu\text{mole/L}$)(86-88). Les inhibiteurs ont diminué l'incorporation de [^3H]-thymidine stimulé par ISO de $87 \pm 9\%$ (n=8) et $92 \pm 6\%$ (n=8) respectivement (fig. 3.2). Pour vérifier si l'effet de tyrphostine A25 est vraie, les cellules ont été pré-traitées avec un analogue de la tyrphostine A25, la tyrphostine A1, qui a eu aucun effet sur l'incorporation de [^3H]-thymidine médié par ISO (résultat non montré).

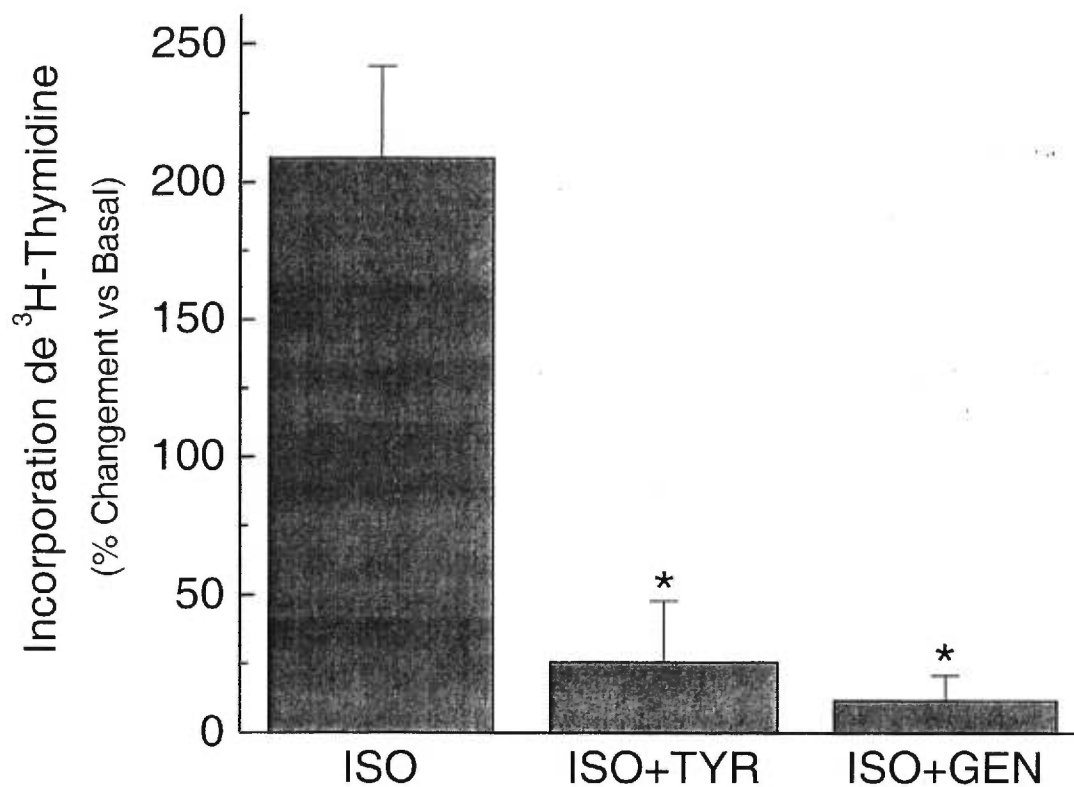


Figure 3.2 : La régulation de la synthèse d'ADN dans les fibroblastes cardiaques par deux inhibiteurs des protéines tyrosine kinases (PTK). Les cellules ont été prétraitées avec soit la tyrphostine (TYR;20 μM) ou le génistéine (GEN;20 μM). Ensuite les cellules ont été lysées et la quantité de thymidine marquée fut mesurée à l'aide du compteur à scintillation β de Beckman.

3.1.4 L'inhibiteur de la farnesyltransférase, le BMS-191563 a diminué la synthèse d'ADN stimulé par ISO

Le proto-oncogène ras est une petite protéine G impliquée dans plusieurs voies de signalisation reliées à la croissance cellulaire (38-41). La détermination de son rôle dans la croissance des fibroblastes cardiaques fut possible grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de la farnesyltransférase, le BMS-191563. Cet inhibiteur empêche l'ajout d'un groupement farnesyl à l'extrémité C-terminale de ras, bloquant ainsi la translocation de ras à la membrane plasmique, rendant ainsi impossible son activation. L'utilisation de la technique d'immunofluorescence, nous a permis de vérifier la localisation de ras dans les fibroblastes cardiaques. La figure 3.3A démontre un modèle d'immunofluorescence contre ras dans les fibroblastes cardiaques non traités, principalement localisé au niveau de la membrane plasmique, et un signal diffus et de faible intensité au niveau du cytoplasme, ainsi qu'au niveau du noyau (n=4) (les cellules proviennent de différentes préparations cellulaires). Cependant, un traitement de 24 h avec le BMS-191563 (50 μ mole/L) n'a démontré aucun signal immunodélectable à la membrane plasmique, confirmant ainsi l'action efficace de cette drogue (fig.3.3B). De façon intéressante, un signal de forte intensité a été observé au niveau périnucléaire et nucléaire, ce qui démontre une redistribution de ras. En parallèle à ces expériences, le pré-traitement des fibroblastes cardiaques avec BMS-191563 (50 μ mole/L) a diminué la synthèse d'ADN médié par ISO de $75 \pm 7\%$ ($p < 0.01$; n=10).

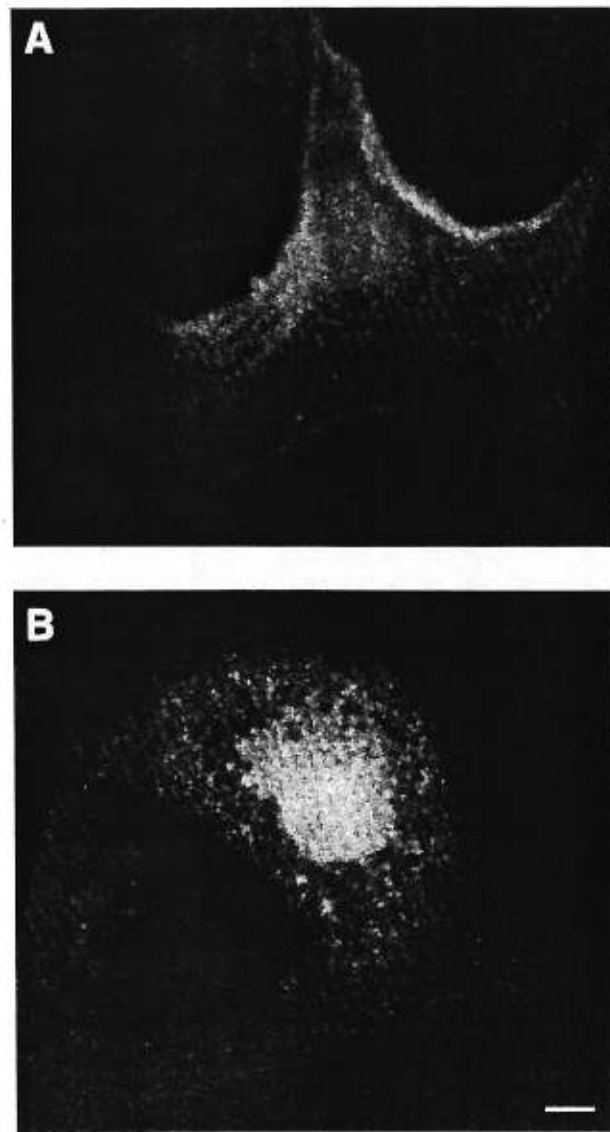


Figure 3.3A et B : Modification post-transcriptionnel de ras est inhibé par le BMS-191563. Cette figure d'immunofluorescence contre ras représente sa localisation (A) au niveau de la membrane des fibroblastes cardiaques non traités et (B) au niveau cytosolique dans les cellules traités avec le BMS-191563 (50 μ M).

3.1.5 ISO active MAPK et PI3-K dans les fibroblastes cardiaques

MAPK et PI3-K sont deux molécules impliquées dans la croissance de plusieurs types cellulaires(27,29,31,35). Leurs rôles ont été étudiés dans la croissance des fibroblastes cardiaques médiée par ISO. La stimulation des fibroblastes avec ISO (1 μ mole/L) a causé une augmentation transitoire de l'activité MAPK, avec une activité maximale à 10 min(5.0 ± 0.76 fois vs contrôle; $p<0.01$; $n=10$), et retourne au niveau contrôle après 30 min de stimulation avec ISO(Fig.3.4A et 3.4B). En parallèle à ces expériences, la stimulation avec ISO a aussi causé une augmentation transitoire de l'activité de PI3-K, dont l'activité est maximale à 10 min(2.4 ± 0.3 fois vs contrôle; $p<0.01$; $n=5$) mais de plus faible intensité et dont l'activité demeure élevée après 60min(Fig.3.4A et 3.4C)

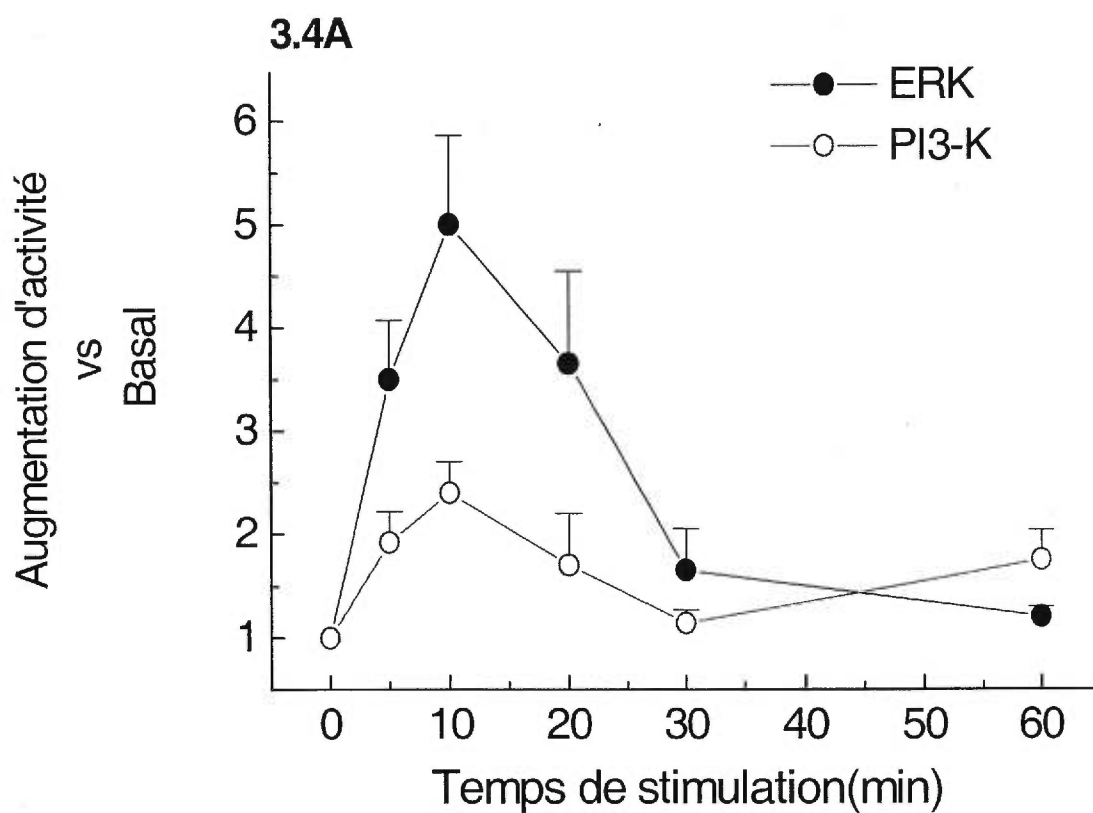


Figure 3.4A: Isoprotérénol (ISO) stimule ERK et PI3-K au niveau des fibroblastes cardiaques. Les cellules quiescentes ont été incubées en présence d'ISO(1 μ M) pendant 5-60 min. (Cette figure fut obtenu par l'analyse des autoradiogramme retrouvés à la page 59)

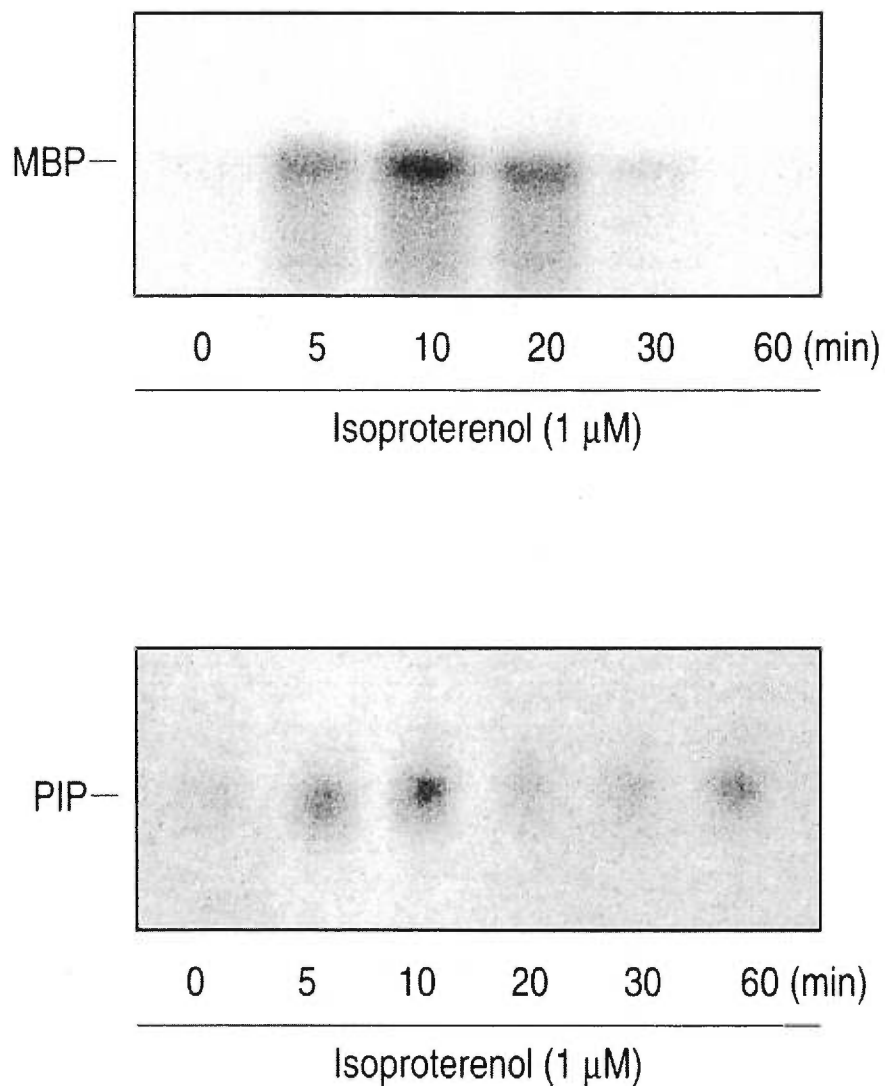


Figure 3.4B et C : ERK et PI3-K sont activés par isoprotérénol (ISO) au niveau des fibroblastes cardiaques. (B) Le traitement avec ISO (1 μ M) pendant 5-60 min augmente l'activité de ERK comme le démontre l'autoradiogramme qui représente l'augmentation de la phosphorylation de MBP(myelin basic protein). (C) Cette même stimulation avec ISO augmente aussi le niveau de phosphorylation du phosphatidylinositol (PI), le substrat de PI3-K.

3.1.6 Le recrutement de PI3-K est un événement essentiel à la synthèse d'ADN stimulée par ISO

Plusieurs études ont démontré l'importance de MAPK dans la croissance de différent type cellulaire. Dans le but d'examiner le rôle de MAPK dans la synthèse d'ADN médiée par ISO, les fibroblastes cardiaques ont été pré-traités 30 min avec le PD098059 (50 μ mole/L), un inhibiteur spécifique de MAPK kinases, MEK-1 et MEK-2(79). Le pré-traitement avec PD098059 a causé une diminution de l'activité de MAPK(stimulé par ISO) de $98 \pm 2\%$ (Fig.3.5A; $p < 0.001$; $n=4$). Cependant, PD09859 n'a eu aucun effet sur la synthèse d'ADN stimulée par ISO ($n=6$; $p=0.2$) (Fig.3.5B). De plus, le traitement avec le PDBU(500 nmole/L), un activateur de la protéine kinase C, a provoqué une augmentation de l'activité de MAPK de 17 ± 6 fois versus l'activité de base (résultat non montré). Cependant, le PDBU a diminué l'incorporation de [3 H]-thymidine de $56 \pm 10\%$ ($p < 0.01$; $n=7$)(résultats non montré). Le pré-traitement des cellules avec le LY294002(10 μ mole/L), un inhibiteur spécifique de PI3-K (53), pour une période de 60 min, a complètement inhibé l'activation de PI3-K ($n=2$) et l'incorporation de [3 H]-thymidine médié par ISO ($n=5$; $p < 0.001$ vs ISO) (Fig.3.6A, 3.6B). En accord avec ces résultats, le pré-traitement avec la rapamycine(10 nmole/L), un inhibiteur de p70S6K, qui est une cible de PI3-K, (80), supprime la synthèse d'ADN médiée par ISO ($p < 0.001$ vs ISO; $n=5$).

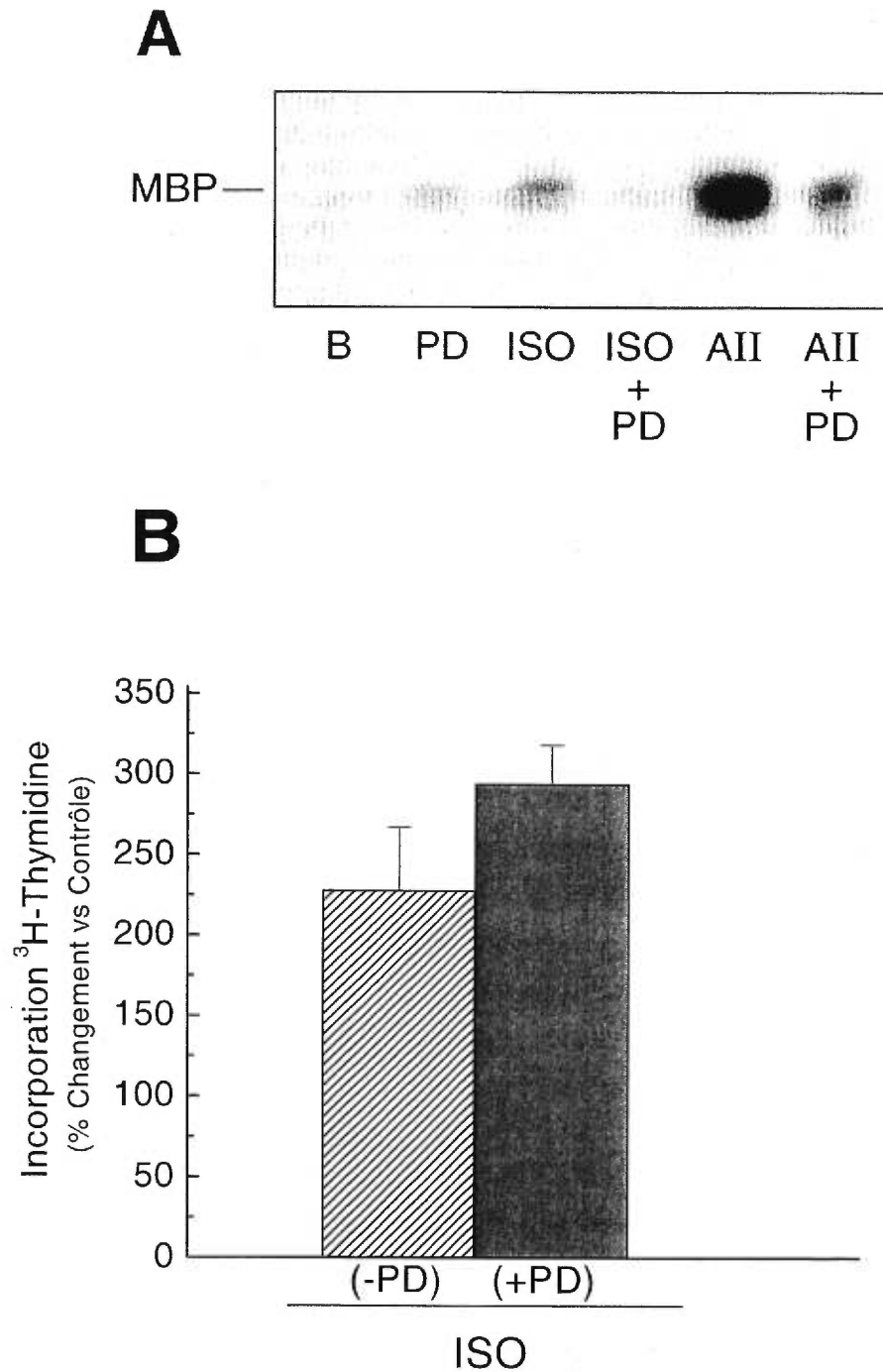


Figure 3.5 : L'inhibiteur de MEK, le PD98059, empêche l'activation de ERK par isoprotérénol (ISO;1 μM). Le prétraitement des fibroblastes cardiaques avec le PD98059 (PD;50 μM) a complètement inhibé la phosphorylation de MBP induit par ISO. (B) Cependant, le PD98059 n'a aucun effet sur l'incorporation de la [^3H]-thymidine stimulé par ISO.

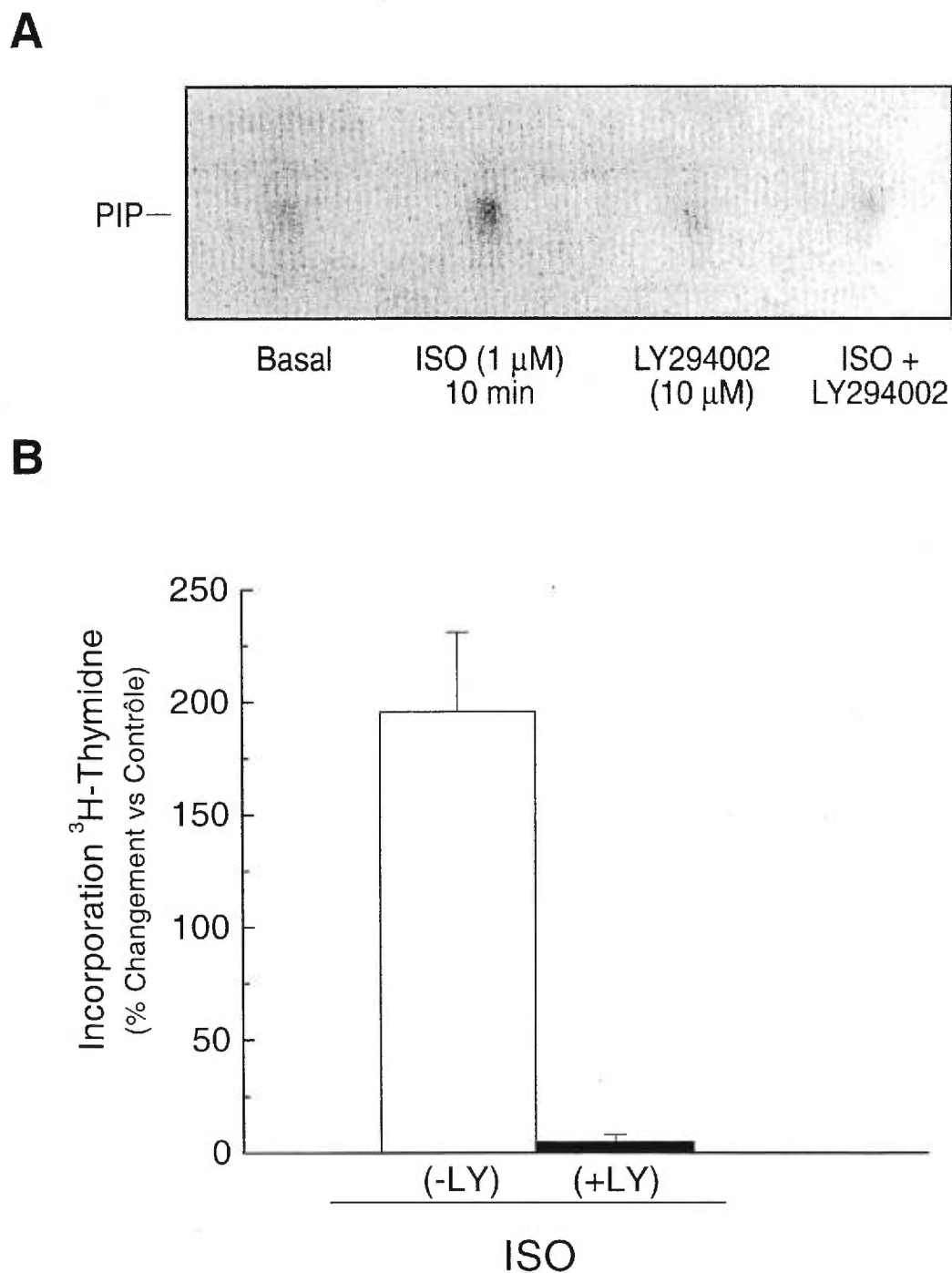


Figure 3.6 : L'inhibiteur pharmacologique spécifique de PI3-K, LY294002 (10 μ M), a complètement inhibé (A) l'activation de PI3-K par isoprotérénol (ISO;1 μ M) et (B) la synthèse d'ADN induit par ISO.

Deuxième partie

3.2 Isoprotérénol et Angiotensine II stimule la synthèse protéique au niveau des fibroblastes cardiaques via une voie PI3-K dépendante

La croissance des fibroblastes cardiaques implique la synthèse de plusieurs protéines structurales dont le collagène et la fibronectine. Dans certaines pathologies telles que l'hypertension, la concentration de certains facteurs telles que l'AngII et une augmentation de l'activité du système sympathique mènent à plus ou moins long terme au développement de la fibrose cardiaque caractérisée par une croissance anormale des fibroblastes et une synthèse accrue de protéines fibreuses qui font partie de la matrice extracellulaire. Par conséquent, ces protéines fibreuses empêchent le fonctionnement normal des cardiomyocytes et mènent ultimement à la défaillance cardiaque.

Vue l'importance des fibroblastes cardiaques et de la synthèse protéique par celles-ci, cette deuxième section portera sur les voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique médiée par l'angiotensine II et l'isoprotérénol (agoniste β -adrénergique). De plus, elle répondra à la question suivante : Est-ce que l'Ang II et l'Isoprotérénol stimulent la synthèse protéique via une voie commune ou différente ?

3.2.1 Angiotensine II et Isoprotérénol stimule la synthèse protéique :

Le traitement des fibroblastes cardiaques pour une période de 24 h avec AngII (1 μ mole/L) a provoqué une augmentation de l'incorporation de [³H]-leucine ($40 \pm 8\%$; n=5; p<0.01 vs contrôle) (fig.3.7). De plus, le pré-traitement (30-60 min) avec l'antagoniste des récepteurs AT₁, l'irbersartan(Bristol Myers Squibb, Québec, Canada), a causé une diminution de la synthèse protéique médiée par Ang II de $66 \pm 3\%$ (n=3)(fig.3.7). De façon intéressante, le traitement des fibroblastes avec l'isoprotérénol (1 μ mole/L) pendant 24 h, a provoqué une augmentation quasi-identique de la synthèse protéique ($40 \pm 6\%$; n=6; p<0.01 vs contrôle)

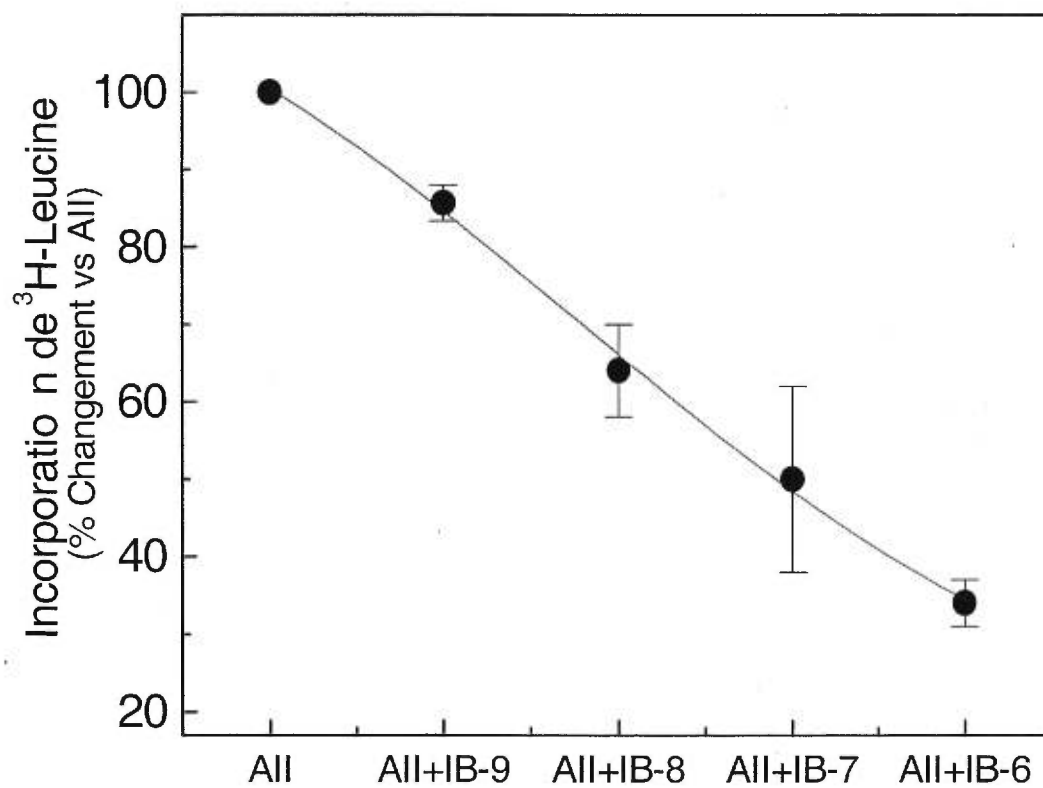


Figure 3.7 : Angiotensine II (All;1 μ M) stimule la synthèse protéique via les récepteurs AT₁. Le prétraitements des fibroblastes cardiaques avec l'antagoniste des récepteurs AT₁, Irbesartan(IB) à des concentrations allant de 1 \times 10⁻⁹ - 1 \times 10⁻⁶ M diminue la synthèse protéique induit par All, de façon dose dépendante.

3.2.2 Le rôle des protéines tyrosine kinase dans la synthèse protéique médiée par l'angiotensine II et l'isoprotérénol :

Le traitement des fibroblastes cardiaques 24 h avec l'inhibiteur des tyrosine kinases, le tyrphostine A25 (20 μ mole/L), n'a eu aucun effet sur l'incorporation de [3 H]-leucine basal (n=6). Cependant, le pré-traitement des cellules pendant 1 h avec le tyrphostine A25, a diminué la synthèse protéique médiée par Ang II, de façon non significative (30%) (fig.3.8). Contrairement à Ang II, le pré-traitement des fibroblastes avec tyrphostine A25 a diminué l'incorporation de [3 H]-leucine stimulé par ISO de 80% (n=6; p<0.01 versus ISO) (fig.3.8).

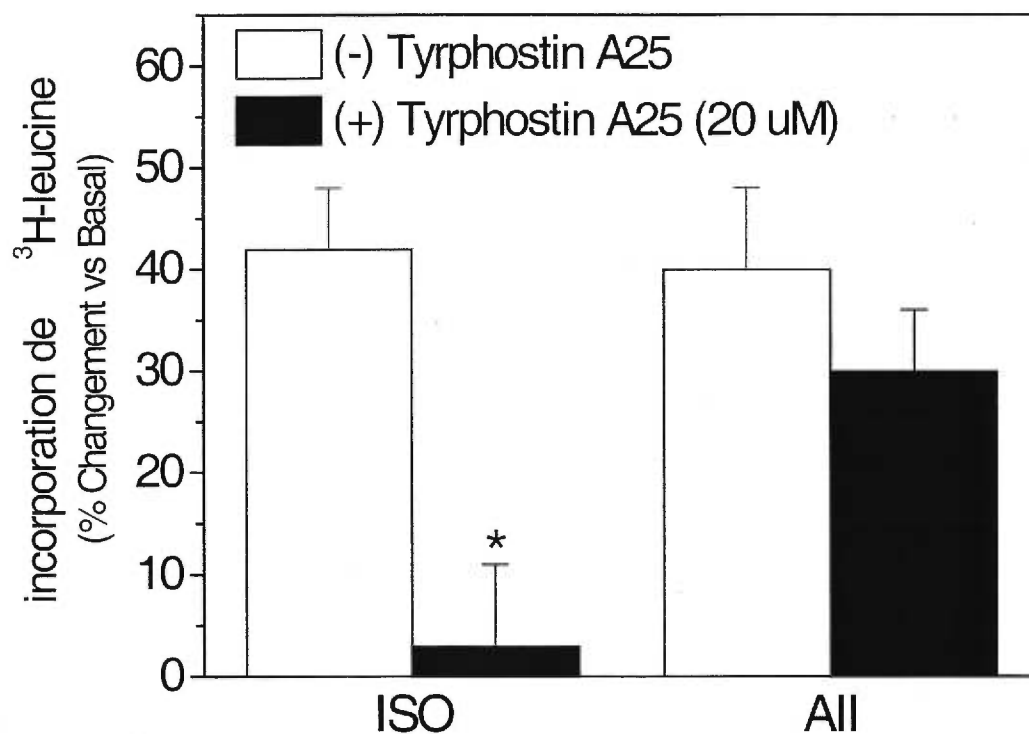


Figure 3.8 : Les protéines tyrosine kinases sont impliqués dans la synthèse protéique induit par isoprotérénol (ISO) au niveau des fibroblastes cardiaques. Les cellules ont été pré-traités avec un inhibiteur des protéines tyrosine kinases, soit la tyrphostine (TYR;20μM). Ce traitement a significativement inhibé la synthèse protéique induit par ISO 1μM mais n'a eu aucun effet sur la synthèse protéique médié par angiotensine II (AII;1μM).

3.2.3 Le rôle de ras dans la synthèse protéique médiée par angiotensine II et isoprotérénol

Le traitement des fibroblastes cardiaques avec le BMS-191563 (50 $\mu\text{mole/L}$), pour une période de 48 h a causé une petite diminution dans l'incorporation de [^3H]-leucine de base (diminution de 22%;n=5). Le pré-traitement des fibroblastes pendant 24 h avec le BMS-191563 (50 $\mu\text{mole/L}$), n'a eu aucun effet sur la synthèse protéique médiée par Ang II (1 $\mu\text{mole/L}$)(fig.3.9). Toutefois, le pré-traitement avec BMS-191563 a causé une diminution de la synthèse protéique médiée par ISO (1 $\mu\text{mole/L}$) de $66 \pm 15\%$ (n=5;p<0.05 versus ISO)(fig. 3.9).

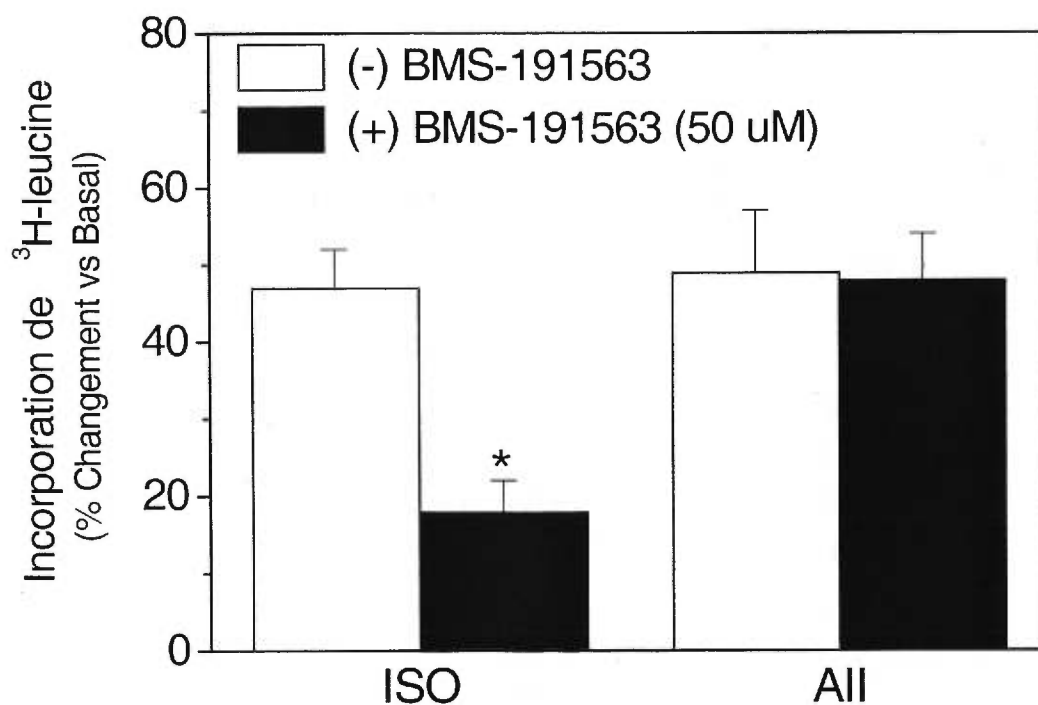


Figure 3.9 : RAS est impliqué dans la synthèse protéique stimulé par isoprotérénol (ISO). Les fibroblastes cardiaques ont été prétraités avec l'inhibiteur de la farnesyltransférase, le BMS-191563 (50 μ M). On note que le BMS-191563 a inhibé de façon significative la synthèse protéique stimulé par ISO 1 μ M. Cependant, la synthèse d'ADN médié par Ang II demeure innacfectée par le prétraitement avec BMS-191563..

3.2.4 Le recrutement de ERK via ras par Angiotensine II et Isoprotérénol, est un événement insuffisant pour promouvoir la synthèse protéique

Le recrutement de ERK par Ang II est un événement qui est observé dans plusieurs types cellulaires (25,29,59). Le traitement des fibroblastes avec Ang II (1 μ mole/L) a causé une augmentation de l'activité de ERK . Cependant, l'activité maximale est obtenue à 5 min (7.9 \pm 0.9 fois versus basal;n=4;p<0.001) et demeure élevée au moins jusqu'à 60 min. En accord avec ces résultats, le contenu en résidu phosphotyrosine de ERK-1 et ERK-2 a aussi augmenté après 5 min de traitement avec Ang II (1 μ mole/L)(résultat non montré) . De plus, dans les fibroblastes cardiaques de rats néonataux, il a été démontré que l'activation de ERK par Ang II se fait en partie via le recrutement de ras (22,54). En accord avec cette découverte, le pré-traitement avec le BMS-191563 (50 μ mole/L), a diminué l'activation de ERK par Ang II de 61 \pm 9% (n=5;p<0.01)(fig.3.10) et le contenu en phosphotyrosine de ERK-1 et ERK-2(résultat non montré). Comme observé dans la première partie de la section résultats, le traitement des fibroblastes cardiaques avec ISO (1 μ mole/L) a aussi causé une augmentation de l'activité de ERK (fig 3.4A et 3.4B) et une augmentation dans le contenu en résidu phosphotyrosine sur ERK-1 et ERK-2(résultat non montré). De plus, le pré-traitement avec le BMS-191563 a également causé une diminution de l'activité de ERK stimulé par ISO (83 \pm 12% versus ISO;n=3;p<0.01)(fig 3.10) et a diminué le contenu en résidu phosphotyrosine de ERK-1 et ERK-2 (résultats non montré).

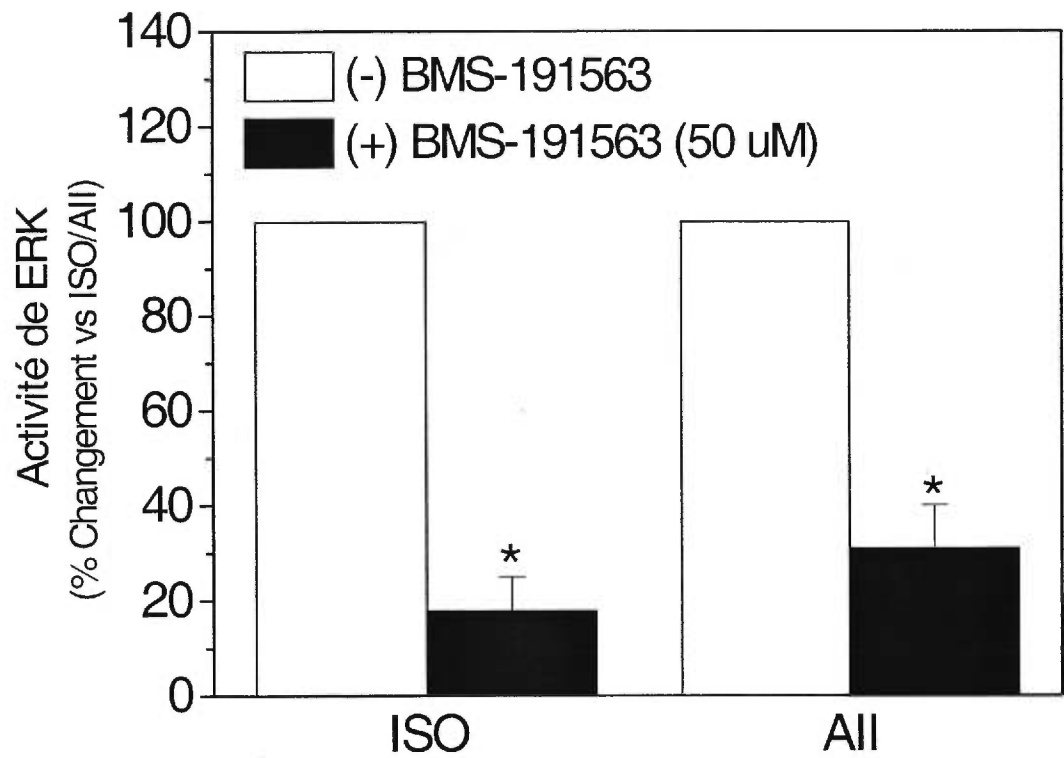


Figure 3.10 : L'activation de ERK se fait via le recrutement de ras. Le pré-traitement avec l'inhibiteur de la farnesyltransférase, le BMS-191563(50 μ M) a significativement ($p < 0.01$) diminué l'activation de ERK par isoprotérénol (ISO; 1 μ M) et angiotensine II (AII; 1 μ M).

Cependant, contrairement à ISO, l'activité maximale de ERK fut observée a 5 min après stimulation avec Ang II et de plus forte intensité que la stimulation avec ISO.

Le résultat obtenu où le pré-traitement avec le BMS-191563 n'a pas inhibé la synthèse protéique médiée par Ang II, malgré l'inhibition de ERK, suggère que ERK ne semble pas impliqué dans la synthèse protéique. Pour confirmer ce postulat, les fibroblastes ont été pré-traités 30 min avec le PD098059 (50 μ mole/L), un inhibiteur pharmacologique de MEK1/MEK2 (79). Le PD098059 a complètement inhibé l'activation de ERK médié par Ang II (Baisse de $93 \pm 4\%$ versus Ang II; n=3) (fig.3.5A). Cependant, le pré-traitement avec PD098059 n'a pas affecté la synthèse protéique stimulée par Ang II (AngII = 35 ± 20 et AngII+PD098059 = 32 ± 18 ; n=5). En addition, le pré-traitement avec PD09859 a aussi inhibé l'activation de ERK médié par ISO (Baisse de $98 \pm 2\%$ versus ISO; n=2)(fig.3.5A) , sans affecter la synthèse protéique stimulé par ISO (résultats non montrés).

3.2.5 Angiotensine II et Isoprotérénol stimulent la synthèse protéique via le recrutement d'une voie PI3-Kinase-dépendante

Le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) joue un rôle important dans la croissance cellulaire, notamment au niveau des fibroblastes cardiaques où l'inhibition de son activité a diminué l'incorporation de [³H]-thymidine (Fig. 3.6B). Nous avons exploré son rôle dans la synthèse protéique stimulée par Ang II et ISO, dans les fibroblastes cardiaques. Le traitement des cellules avec Ang II (1 µmole/L) a augmenté l'activité de PI3-K de façon modeste et non significative après 5 min de stimulation ($36 \pm 18\%$ versus basal; $n=3$; $p>0.05$, fig. 3.11B). Cependant, après 10 min de stimulation avec Ang II, l'activité basale de PI3-K a augmenté de façon significative ($121 \pm 16\%$ versus basal; $n=4$; $p<0.01$) et demeure élevée après 20 min de stimulation ($90 \pm 12\%$ versus basal; $n=4$; $p<0.01$) (Fig. 3.11B). Le pré-traitement avec Wortmannin (100 nM), un inhibiteur de PI3-K (89), a inhibé l'activation de PI3-K stimulée par Ang II ($n=2$) (résultats non montrés). De plus, le pré-traitement avec un autre inhibiteur de PI3-K, le LY294002 (10 µmole/L), a aussi inhibé l'activation de PI3-K par Ang II ($n=2$) (résultat non montré). En parallèle à ces expériences, le wortmannin (100 nM) a diminué l'incorporation de [³H]-leucine médiée par Ang II de $65 \pm 6\%$ ($n=5$; $p<0.01$). De façon similaire, le pré-traitement avec le LY294002 (10 µmole/L) a aussi diminué la synthèse protéique médiée par Ang II (Fig. 3.12).

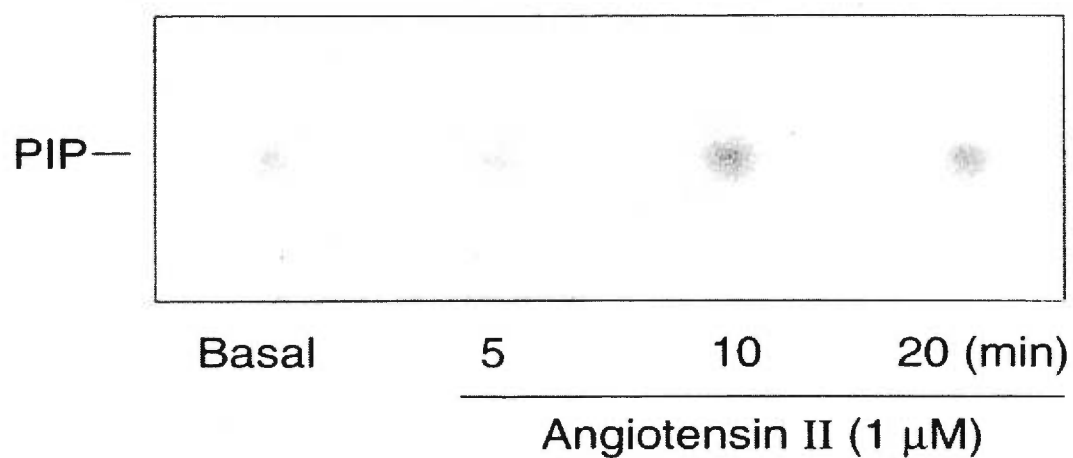
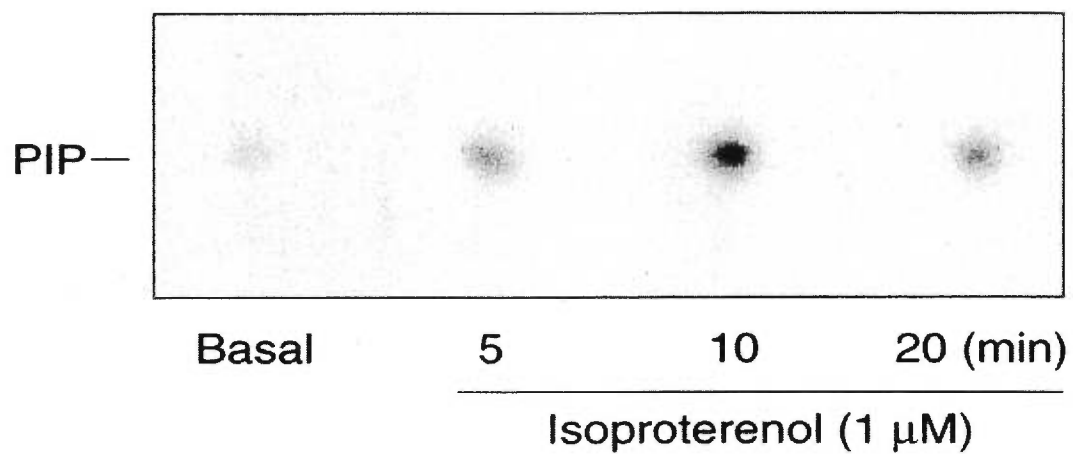
A

Figure 3.11A et B : Isoprotéréno (ISO) et angiotensine II (AngII) recrute le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) au niveau des fibroblastes cardiaques. (A) L'incubation des cellules avec ISO(1 μ M) ou (B) AngII(1 μ M) augmente la phosphorylation du substrat de PI3-K, le PI, c'est-à-dire son activité.

En parallèle à ces expériences, le traitement avec ISO a augmenté de façon significative l'activité de PI3-K après 5 min de stimulation ($92 \pm 30\%$ versus basal; $n=5$; $p<0.05$), et à 10 min de stimulation avec ISO, l'activité de PI3-K était maximale ($140 \pm 32\%$ versus basal; $n=5$; $p<0.01$) (fig. 3.11A). Cette activité est demeurée élevée jusqu'à 20 min de stimulation mais ne fut pas statistiquement significative ($70 \pm 50\%$; $n=5$; $p=0.2$) (Fig.3.11A). Le pré-traitement avec le LY294002 ($10 \mu\text{mole/L}$) pendant 1 h, a inhibé l'activation de PI3-K stimulée par ISO ($n=2$) (Fig.3.6A). Finalement, le pré-traitement avec le LY294002 a aussi diminué la synthèse protéique médiée par ISO de $57 \pm 10\%$ ($n=6$; $p<0.01$ versus ISO) (Fig.3.12).

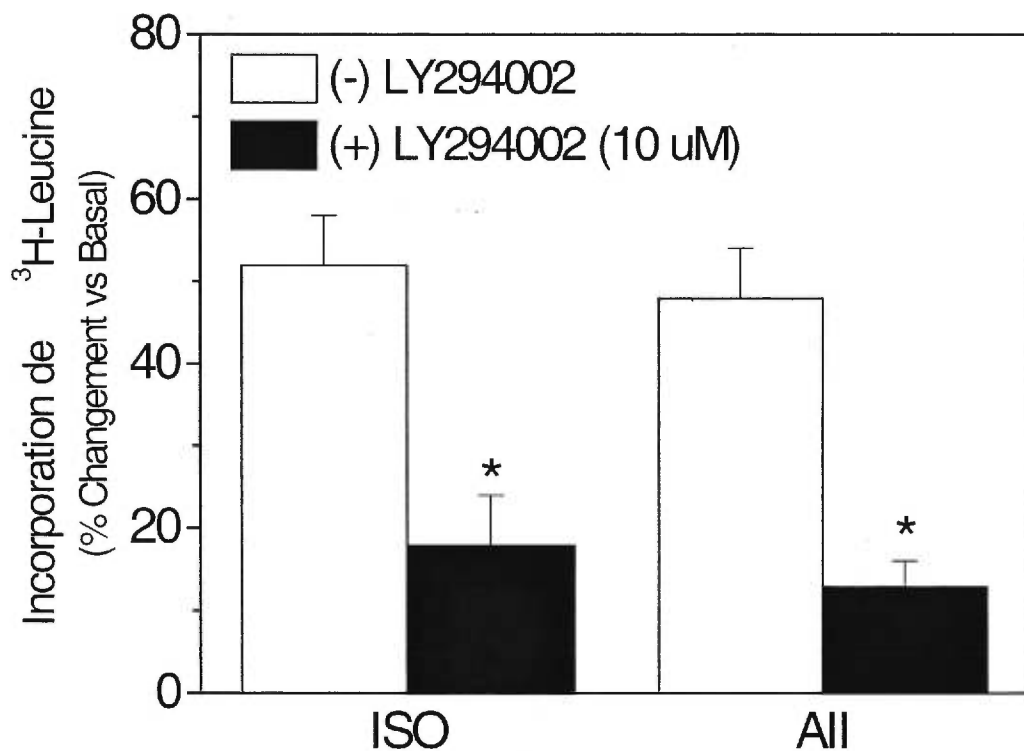


Figure 3.12 : Rôle de PI3-K dans la synthèse protéique au niveau des fibroblastes cardiaques. Le pré-traitement des cellules avec l'inhibiteur pharmacologique spécifique de PI3-K, le LY294002 (10 μ M), a inhibé l'incorporation de ³H-Leucine stimulé par isoprotérénol (ISO; 1 μ M) et angiotensine II (All; 1 μ M).

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 DISCUSSION

La première partie de cette discussion portera sur la première partie de la section résultats et la deuxième partie de cette discussion portera sur la deuxième section résultats.

4.1.1 Première partie

Les fibroblastes cardiaques représentent environ les deux tiers de la population cellulaire au niveau du cœur. Dans certaines pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension, les fibroblastes cardiaques sont exposés à plusieurs facteurs dont ceux qui stimulent leur prolifération comme le système sympathique. Cette prolifération excessive des fibroblastes est accompagnés d'une synthèse accrue de protéines faisant partie de la matrice extracellulaire et de leur sécrétion dans le milieu interstitiel. Par conséquent, cette accumulation de protéines diminue la contractilité ventriculaire et contribue à long terme au développement de l'insuffisance cardiaque. Ceci dit, une meilleure compréhension des voies de signalisation couplés à la croissance des fibroblastes cardiaques, sera un excellent outil pour l'industrie pharmaceutique pour ainsi concevoir des agents thérapeutiques dirigés contre des événements critiques impliqués dans la croissance des fibroblastes cardiaques.

Au niveau des fibroblastes cardiaques, la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques avec l'isoprotérénol(ISO) recrute deux voies de signalisations distinctes; une voie tyrosine kinase dépendante incluant ras, ERK et PI3-K et

une voie couplée à la génération de l'AMPc via la protéine Gs. Le traitement des fibroblastes cardiaques avec des agents qui augmentent la concentration de l'AMPc, inhibe de façon significative l'incorporation de ^3H -thymidine, ce qui supporte l'effet anti-prolifératif de l'AMPc observé dans d'autres types cellulaires. Cependant, malgré l'augmentation d'AMPc causé par le traitement avec ISO, on observe de façon simultanée une augmentation de la synthèse d'ADN via le recrutement de ras et de PI3-K. Ces résultats démontrent que malgré l'augmentation de la concentration d'AMPc, la voie ras-PI3-K recrutée par ISO surpasse l'effet inhibiteur de l'AMPc sur la croissance des fibroblastes cardiaques.

Les agents pharmacologiques augmentant la concentration d'AMPc intracellulaire sont généralement connus comme étant des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. De plus, des études récentes supportent leur utilisation comme approche thérapeutique pour combattre différentes formes de croissance cellulaire tumorales(74-76). Dans l'étude présente, l'induction de la synthèse d'ADN par ISO était aussi associée à une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire. De plus, le traitement avec différents agents qui augmentent la production d'AMPc ont tous inhibé la synthèse d'ADN médiée par ISO, ce qui supporte l'existence d'une voie AMPc dépendante qui inhibe la croissance des fibroblastes cardiaques. Toutefois, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire observée suite au traitement avec ISO n'a aucun effet sur l'incorporation de ^3H -thymidine. En parallèle à ces

expériences, le pré-traitement avec deux inhibiteurs des protéines tyrosine kinases soit le génistéine et tyrphostin A25 a inhibé la synthèse d'ADN induit par ISO, ce qui supporte l'implication des protéines tyrosine kinase dans la croissance cellulaire des fibroblastes cardiaques (87,88). En effet, plusieurs études ont démontré que les récepteurs β_2 -adrénergiques sont couplés à des protéines tyrosines kinases. Cependant, aucune corrélation physiologique ne fut attribuée à cette voie (77,90). Ainsi, les récepteurs β_2 -adrénergiques, du moins au niveau des fibroblastes cardiaques, sont couplées à deux voies de signalisation distinctes ayant des effets réciproques. Toutefois, la voie couplée aux protéines tyrosine kinase dépendent surpasse l'effet inhibiteur de l'AMPc sur la croissance.

La génération de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et du diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C, représente deux évènements proximaux couplés aux protéines Gi/Gq (91). L'augmentation du calcium intracellulaire et de Ca^{2+} /DAG permettra ainsi de recruter différents isoformes de la famille PKC, couplés aux protéines tyrosines kinases (92-94). De plus, des études récentes ont démontrés que les évènements liées aux protéines Gi/Gq représentent des voies alternatives couplées aux récepteurs β_2 -adrénergiques. Dans les cardiomyocytes, la voie couplée aux récepteurs β_2 -adrénergiques via Gi agit comme un mécanisme rétro-actif qui module la réponse contractile médiée par Gs et dans les cellules HEK 293, la voie β_2 -adrénergique couplée à Gi, permet le recrutement des protéines tyrosine kinase (83,90). Dans les érythrocytes de dinde, les agonistes β -adrénergiques augmentent la concentration d' IP_3 via

l'activation de la phospholipase C β via la protéine G_{11} , un membre de la famille Gq (84), et dans les cellules épithéliales du tubule proximal du rat, elle augmente l'activité de la protéine kinase C(95). Dans l'étude présente, le pré-traitement des fibroblastes cardiaques avec la toxine de Pertussis, n'a eu aucun effet sur la synthèse d'ADN médié par ISO. De plus, ISO n'a eu aucun effet sur la production d' IP_3 . Finalement, le traitement des fibroblastes avec le phorbol ester PDBU, a diminué l'incorporation de 3H -thymidine. Ces résultats en partie, sont en accord avec l'étude de Booz et collaborateurs qui ont démontré que les isoformes de PKC sensible au phorbol ester ne contribuent pas à la synthèse d'ADN dans les fibroblastes cardiaques de rats néonataux(96). Ces résultats suggèrent que ni les événements reliés à G_i ou à Gq ne peuvent médier le recrutement des événements reliés à la voie des protéines tyrosine kinase impliqués dans la synthèse d'ADN induit par ISO.

La modification post-transcriptionnelle à l'extrémité C-terminale de ras consiste en l'ajout d'un groupement farnesyl sur le résidu cystéine de motif CAAX par une enzyme connue sous le nom de farnesyltransferase. Cette modification est essentielle pour relocaliser ras à la membrane plasmique pour ainsi faciliter l'activation de ras (97). Ceci dit, l'utilisation de molécules inhibant l'activité de la farnesyltransférase, fut démontrée d'être une approche thérapeutique efficace contre la croissance tumorale de plusieurs types cellulaires à caractère tumoral ras-dépendent (97-100). Récemment, deux études ont démontré que les récepteurs β -adrénergiques, peuvent recruter le proto-oncogène ras. Cependant, aucun rôle physiologique ne lui fut attribué

(90,91). Dans l'étude présente, le rôle de ras dans la synthèse d'ADN induit par ISO fut déterminé à l'aide d'un inhibiteur de la farnesyltransférase BMS-191563. Dans les fibroblastes cardiaques non traités, les études d'immunofluorescence dirigées contre ras nous démontrent un modèle de fluorescence intense principalement au niveau de la membrane plasmique et un modèle de fluorescence de faible intensité au niveau de la région cytoplasmique et nucléaire. Dans les fibroblastes cardiaques non traités avec le BMS-191563, le modèle de fluorescence observé au niveau de la membrane plasmique n'y est plus dans la plupart des cellules examinées et contrairement aux cellules non traitées, un signal fort est clairement détecté dans la région périnucléaire et nucléaire.

De façon intéressante, une étude récente a démontré dans les cellules NIH 3T3, que l'enlèvement du motif CAAX situé à l'extrémité c-terminale du proto-oncogène p21^{k-ras(B)}, résulte en la redistribution de ras sans groupement farnesyl dans la région périnucléaire et nucléaire (100). Cette étude démontre des résultats qui sont consistants avec les résultats obtenus avec les études d'immunofluorescence contre ras obtenue dans les fibroblastes cardiaques traité avec le BMS-191563. En parallèle à ces expériences, le pré-traitement avec le BMS-191563 a diminué de façon significative l'incorporation de ³H-thymidine dans les fibroblastes cardiaques. De plus, des études préliminaires ont démontré que le BMS-191563 inhibait l'activation de MAPK par ISO (Observations non publiées), ce qui nous démontre la spécificité de cette molécule à inhiber l'activation des événements relié à la voie de ras.

Globalement, ces résultats supportent des études antérieures où les récepteurs β_2 -adrénergiques peuvent recruter le proto-oncogène ras. De plus ce sont les premières études qui démontrent un rôle physiologique relié à la synthèse d'ADN médié par les récepteurs β_2 -adrénergiques et stimulé par ISO dans les fibroblastes cardiaques.

Le traitement des fibroblastes cardiaques avec ISO a augmenté l'activité de MAPK et de PI3-K et ces deux événements reliés à la voie tyrosine kinase dépendent, ont été démontrés d'être impliqués dans la croissance cellulaire (92). Cependant, malgré leur activation simultanée, plusieurs études ont démontré que PI3-K au lieu de MAPK, était essentiel aux événements reliés à la croissance(101-103). Dans l'étude présente, malgré l'augmentation de l'activité de MAPK, le pré-traitement avec un inhibiteur de MEK1/2 PD098059 n'a pas supprimé la synthèse d'ADN médié par ISO. En accord avec ces résultats, Booz et collaborateurs ont démontré que l'activation de MAPK était insuffisante pour induire la prolifération des fibroblastes cardiaques en réponse à l'angiotensine II et le PDGF (96). Cependant, le pré-traitement avec un inhibiteur spécifique de PI3-K, le LY294002 (79), a inhibé de façon significative l'activité de PI3-K ainsi que la synthèse d'ADN induit par ISO. De plus, une cible de PI3-K est l'enzyme p70/85^{S6K} qui régule la synthèse protéique via la phosphorylation de la sous-unité ribosomale 40S6(40S ribosomal protein S6)(80,92). En accord avec ce concept, le pré-traitement des fibroblastes cardiaques avec rapamycine un immunosuppressant connu pour ses effets inhibiteurs sur l'activité de

p70/85^{S6K} (80), inhibe aussi la synthèse d'ADN induit par ISO. Collectivement, ce sont les premiers résultats qui démontrent le recrutement de PI3-K par les récepteurs β_2 -adrénergiques et donnent un rôle fonctionnel à la voie tyrosine kinase dépendante relié à la synthèse d'ADN induit par ISO dans la croissance des fibroblastes cardiaques.

Dans cette étude, il existe un paradoxe évident où l'ISO stimule MAPK et PI3-K malgré l'augmentation simultanée de l'AMPc. Il a été démontré que la voie AMPc-dépendante inhibe le recrutement de MAPK et de PI3-K par l'intermédiaire de ras(103-106). Par contre, le mécanisme d'action de cet effet reste indéterminée. Cependant, il est bien connue que l'AMPc agit à travers la protéine kinase A pour inhiber l'activation de MAPK médiée par ras en ciblant un événement relié à la voie MAPK connue sous Raf(MAPKKK)(104,105). Par contre, dans certains types cellulaires, une variété de stimuli peuvent recruter MAPK malgré l'inhibition simultanée qu'exerce l'AMPc sur Raf, supportant ainsi l'existence d'une voie insensible à la voie AMPc-Raf(107,108) Ceci dit, les résultats présentés dans cette étude sont en accord avec le concept suivant où le recrutement de MAPK et de PI3-K par ISO se fait via une voie encore non identifiée liée aux événements tyrosine kinase dépendantes, insensibles à l'effet inhibiteur de l'AMPc.

Le phosphatidylinositol 3-kinase est une enzyme hétérodimérique constituée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Il a été démontré que l'activation de PI3-K peut se faire via le recrutement de ras (92,109,110). De plus, une étude récente a démontré une

liaison directe entre ras et la sous unité catalytique p110 α , malgré une faible activité de PI3-K observé(32). De façon intéressante, bien que le rôle essentiel de PI3-K et de ras dans la croissance cellulaire des cellules vasculaires du muscle lisse médié par les récepteurs α -adrénergiques, PI3-K fut localisé en amont de ras, facilitant ainsi la formation de ras-GTP(111). De plus, une nouvelle voie de signalisation alternative fut récemment identifiée qui démontre que l'activation de PI3-K se fait via une voie ras-dépendente(112). Cette voie consiste en l'activation d'une nouvelle sous-unité p110 dénoté p110 γ qui ne requiert pas la liaison de la sous-unité p85 et qui est directement recrutée par les sous-unités G $\beta\gamma$ relâché suite à l'activation du récepteur(112). Collectivement, ces résultats démontrent que les voies ras-dépendant et ras-indépendent peuvent tout deux activer plusieurs isoformes de PI3-K. Dans l'étude présente, la mesure de l'activité de PI3-K fut possible grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre les sous-unités régulatrices p85 α et p85 β qui tous deux peuvent former un complexe hétérodimérique avec la sous-unité catalytique p110 α et/ou p110 β (112). Ceci dit, l'activation de p85-p110/PI3-K par ISO est un résultat qui est consistant avec d'autres études qui supportent que ces isoformes sont des événements de la voie ras dépendante. Cependant, est-ce que l'activation de PI3-K est un événement qui est proximal ou distal à ras dans la stimulation de la synthèse d'ADN reste à être déterminé. Finalement, ni Gs ou Gi/Gq semble médié la synthèse d'ADN ou recruter la voie ras-dépendente, induit par ISO. Récemment, les sous-unités G $\beta\gamma$ ont été démontrées d'être un événement proximal au

recrutement de ras par les récepteurs β -adrénergiques(77,90). Ceci dit, leur rôle dans le recrutement de ras par ISO dans les fibroblastes cardiaques mérite d'être sous investigation.

En utilisant une approche pharmacologique, l'étude présente démontre l'implication d'une voie ras-dépendante, comme un événement proximal qui est essentiel à la synthèse d'ADN médié par ISO. De plus, le recrutement de PI3-K représente un nouvel élément de signalisation couplé au récepteur β_2 -adrénergique et c'est la première molécule effectrice de la voie tyrosine kinase dépendante qui médie la croissance des fibroblastes cardiaques de rats néonataux induit par ISO. Ces résultats sont les premiers à démontrer la corrélation physiologique du recrutement de la voie tyrosine kinase dépendante par les récepteurs β_2 -adrénergiques. Bref, ces observations nous donnent un paradigme unique pour élucider les mécanismes par lesquels la voie tyrosine kinase dépendant couplés à la croissance, surpasse l'effet inhibiteur de l'AMPc.

4.1.2 Deuxième partie

Dans cette étude, nous avons démontré que le traitement avec ISO avait augmenté la synthèse d'ADN via le recrutement d'une voie ras-PI3-K-dépendante. Intéressamment, dans la deuxième partie des résultats, le traitement avec ISO a aussi augmenté la synthèse protéique via une voie identique, c'est-à-dire via une voie ras-PI3-K-dépendante. En parallèle à ces expériences, le traitement avec l'Ang II a causé une augmentation de la synthèse protéique de façon similaire à ISO. De plus, comme ISO, Ang II a recruté ras, ERK et PI3-K. Cependant, contrairement à ISO, le pré-traitement avec le tyrphostine A25 et le génistéine, deux inhibiteurs des protéines tyrosine kinases, a eu aucun effet sur la synthèse protéique stimulée par Ang II. Ces résultats constituent la première différence entre la synthèse protéique médiée par ISO et Ang II. Dans la littérature, il est bien connu que l'activation de ERK se fait via le recrutement de ras (38,43,60). Effectivement, nos résultats démontrent que le pré-traitement avec l'inhibiteur de la farnesyltransférase, le BMS-191563, a inhibé l'activation de ERK par Ang II mais contrairement à ISO elle n'a pas affecté la synthèse protéique induite par Ang II, suggèrent ainsi que la synthèse protéique stimulé par Ang II se fait via une voie ras et ERK indépendant. Ces résultats sont en accord avec d'autres études antérieures qui démontrent que le recrutement de ras et ERK ne sont pas essentiels à la croissance cellulaire (38,43,96). En dernier lieu, nous avons examiné le rôle de PI3-K dans la synthèse protéique stimulé par Ang II en pré-traitant les fibroblastes cardiaques avec le LY294002 et le Wortmannin, deux inhibiteur de PI3-K (33,89). Premièrement, le traitement

avec Ang II a augmenté la phosphorylation du phosphatidylinositol en position 3' du cycle inositol. Le pré-traitement avec le LY294002 et/ou le Wortmannin a inhibé l'activation de PI3-K et a diminué de façon significative la synthèse protéique induit par Ang II. Ces résultats sont en accord avec une étude récente où le traitement avec Ang II a recruter PI3-K et son inhibition avec le LY294002 a inhibé la croissance cellulaire (33).

PI3-K est recruter par le traitement avec ISO et Ang II. Dans ces deux voies qui stimule la synthèse protéique de façon quasi-identique, le recrutement de PI3-K est un événement essentiel. Cependant, ISO stimule la synthèse protéique via une voie ras-PI3-K-dépendente et Ang II via une voie PI3-K dépendente et ras-indépendant. Malgré le recrutement de PI3-K par ISO et Ang II, il peut s'agir de différentes classes de PI3-K recruter. Pourquoi? Premièrement, la technique utilisé nous permet d'immunoprécipiter PI3-K de classe 1A . Deuxièmement, ISO et Ang II stimule l'activité de cette classe. Cependant, ISO stimule PI3-K via une voie ras dépendente, ce qui est consistant avec le PI3-K de classe 1A, qui contient un domaine de liaison à ras, mais on ne sait pas si ras est couplé directement à PI3-K. Pour ce qui est du recrutement de PI3-K par Ang II, on pense que l'isorforme impliqué dans la synthèse protéique est différente car le recrutement de ras n'est pas essentiel à la synthèse protéique, et il pourrait s'agir de PI3-K de la classe IB qui peuvent être activé par les sous-unités G $\beta\gamma$. De plus, nous avons d'autres résultats préliminaire qui appuit notre hypothèse. Ces résultats démontrent que le pré-traitement avec le wortmannin inhibe la synthèse protéique médié par Ang II mais n'a aucune effet sur la

synthèse protéique induit par ISO. Ce qui pourrait suggérer que le wortmannin aurait plus d'affinité pour différente classe de PI3-K et supportent l'hypothèse où la synthèse protéique stimulé par ISO et/ou Ang II pourrait impliqué différentes classes de PI3-K. Bref, ces résultats sont les premiers à démontrés l'importance de PI3-K dans la synthèse protéique stimulé par ISO et Ang II et qui possiblement implique le recrutement de différentes classes de PI3-K.

Globalement, cette étude est la première à démontré que la synthèse protéique stimulé par ISO et Ang II, est un événement PI3-K-dépendent. De plus, on observe qu'il y a des différences entre ces deux voies, que ISO stimule la synthèse protéique via une voie ras-PI3-K-dépendente et Ang II via une voie PI3-K dépendente. Malgré cette différence, le recrutement de PI3-K est essentiel à la synthèse protéique et que l'inhibition de PI3-K pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante pour diminuer le développement de la fibrose cardiaque observé dans plusieurs maladies cardiovasculaires.

4.2 Conclusion

Finalement, cette thèse a démontré pour la première fois, que la stimulation des récepteurs β_2 –adrénergiques avec l'Isoprotérénol dans les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés, permet d'activer au moins deux voies de signalisation, une voie AMPc-dépendante qui exerce une action inhibitrice sur la croissance cellulaire et une voie ras et PI3-K –dépendante qui est essentiel à la synthèse d'ADN stimulé par ISO et qui surpasse la voie inhibitrice de l'AMPc.

Dans la deuxième partie de cette thèse, il a été possible de comparer deux voies de signalisation qui stimule la synthèse protéique de façon similaire. La voie stimulé par l'Ang II est couplé au recrutement de ras, ERK et de PI3-K. Cependant, les études à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, ont démontrés que la synthèse protéique est médié par une voie PI3-K-dépendante et ras-indépendante. De façon intéressante, la stimulation avec ISO a aussi recruté ras, ERK et PI3-K, mais le recrutement d'une voie ras et PI3-K-dépendante était essentiel à la synthèse protéique médié par ISO.

En conclusion, ces résultats peuvent être très importante au niveau thérapeutique. Le recrutement de PI3-K par différentes voies de signalisations couplées à la croissance des fibroblastes cardiaques, semble crucial et dans ce sens l'inhibition de cette voie pourrait ultimement diminué le dépôt de protéines dans la matrice extracellulaire du myocarde, diminué le phénomène de fibrose et peut-être empêcher le développement de l'insuffisance cardiaque.

Chapitre 5

Références

1. Statistiques de l'Association des Maladies cardio-vasculaires du Québec 1999.
2. Levy Daniel, Anderson Kevin M., Savage Daniel D., Kannel William B., Christiansen Jane C.; and Castelli William P.. Framingham. Massachusetts; Bethesda; and Boston, Massachusetts. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: Prevalence and risk factors. *Annals of internal Medicine*, 1988; 108: 7-13.
3. Weber, *Journal of American cell cardiology*, 1989: 1637-1652.
4. Weber Karl T., MD, and Brilla Christian G., MD, PhD. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation* 1991; 83:1849-1865.
5. Weber Karl T. Fibrosis, a common pathway to organ failure: Angiotensin II and tissue repair. *Seminars in Nephrology*, vol 17, No 5 (September), 1997:pp 467-491.
6. Patterson J.Herbert, Pharm.D, and Kirkwood F. Adams, Jr., M.D. Pathophysiology of heart failure: Changing Perceptions. *Pharmacotherapy*. 1996; 16(2 Pt 2): 27S-36S
7. Boluyt Marvin O., Bing Oscar H.L.. The lonely failing heart: a case for ECM genes. *Cardiovasc. Res.* 1995; 30:835-840.
8. Cleutjens Jack P.M. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32:816-821.
9. Pelouch Vaclav, Dixon Ian M.C, Golfman Leonard, Beamish Robert E. and Dhalla Naranjan S.. Role of the extracellular matrix in the heart function. *Mol Cell Biochem* 129: 101-120, 1993.
10. Ju Haisong MD, Dixon Ian MC PhD. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 1996; 12(12): 1259-1267.
11. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JPM. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994; 26:279-292.
12. Chapman Douglass, Weber Karl T, and Eghabali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement type IV collagen gene

- expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ. Res.* 1990; 67: 787-794.
13. Bishop JE, Laurent GL. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J.* 1995; 16(Suppl C): 38-44.
 14. Contard Francis, Koteliansky Victor, Marotte Françoise, Dubus Isabelle, Rappaport Lydie, and Samuel Jane-lyse. Specific alterations in the distribution of extracellular matrix components within rat myocardium during the development of pressure overload. *Lab investigation* 1991; 64: 65-75. Crawford Denis C., Chobanian A.V, Brecher Peter. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res.* 1994; 74:727-739.
 15. Crawford Denis C., Chobanian A.V, Brecher Peter. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res.* 1994; 74:727-739.
 16. Mamuya Wilfred S. and Brecher Peter. Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J. Clin. Invest.* 1992. 89: 392-401.
 17. Ahumada Gail G., M.D and Saffitz Jeffrey E., M.D. Fibronectin in the heart: A link between cardiac myocytes and collagen. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 1984; 32(4): 383-388.
 18. Casscells W, Kimura H, Sanchez JA, Yu ZX, Ferrans VJ. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 1990; 137: 801-810.
 19. Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. Fibronectin expression during physiology and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27:981-990.
 20. Samuel Jane Lyse, Barrieux Alice, Dufour Sylvie, Dubus Sylvie, Contard Koteliansky and Rappaport Lydie. Accumulation of fetal fibronectin mRNA's during the development of rat cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J Clin. Invest.* 1991; 88: 1737-1746

21. Tyagi Suresh C., Kumar Suresh G., Banks Jeffery and Fortsan Wilbert. Co-expression of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase in myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27: 2177-2189.
22. Booz George W. and Baker Kenneth M. Molecular signaling mechanism controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995; 30:537-543.
23. Schorb Winfried, Booz George W., Dostal David E., Kathleen M., Conrad Kevin C. Chang, and Baker Kenneth M. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 1993; 72:1245-1254.
24. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1993; 268:14553-14556.
25. Lopez-Illasca Marco. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem. Pharm.* 1998; 56:269-277.
26. Schorb Winfried, Conrad Kathleen M., Singer Harold A., Dostal David E., and Baker Kenneth M.. Angiotensin II is a potent stimulator of MAP-Kinase activity in neonatal rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27:1151-1160.
27. Blenis J. Signal Transduction via the MAP kinases: proceed at your own risk. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:5889-5892.
28. Gutkind J. Silvio. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 199; 273:1839-.
29. Cobb Melanie H., Goldsmith Elizabeth J. How MAP Kinases are regulated. *J Biol Chem.* 1995; 14843-1846.
30. Tomosaburo Takahashi, Yasuhiro Kawahara, Masanori Okuda, Hikaru Ueno, Akira Takeshita and Mitsuhiro Yokoyama. Angiotensin II stimulates mitogen-activated protein kinases and protein synthesis by a Ras-independent pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1997; 272:16018-16022.

31. Lyuba Varticovski, Duygu Harrison-Findik, Marilyn L. Keeler, Mira Susa. Role of PI 3-kinase in mitogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994; 1226:1-11.
32. Rodriguez-Viciano P, Warnat PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of ras. *Nature* 1994; 370:527-532.
33. Saward Laura and Zahradka Peter. Angiotensin II activates phosphoinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1997; 81:249-257.
34. Kapeller Rosana, Cantley Lewis C. Phosphatidylinositol 3- Kinase. *BioEssays.* 1994; 16(8): 565-576.
35. Carpenter and Cantley L.C. *Biochimica and Biophysica Acta* 1996; 1288: M11-M16.
36. Malarkey Kevin, Belham Christopher M., Paul Andrew, Graham Anne, McLees Angela, Scoott Pamela H. and Plevin Robin. The regulation of tyrosine kinase signaling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 1995; 309:361-375.
37. Lewin Benjamin. *GENES V.* 1994; 330-336.
38. Joneson Tom, Bar-Sagi Dafna. Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med.* 1997; 75:587-593.
39. Cox Adienne D., Solski Patricia A., J. Jordan Dedrick, and Channing J. Der, Analysis of Ras Protein Expression in Mammalian Cells. *Methods in Enzymology.* 255: 195-220, 1995.
40. Hall Alan. A biochemical function for Ras-At last. *Science* 1994; 264:1413-1414.
41. Campbell Sharon L, Khosravi- Far Roya, Rossman Kent L, Clark Geoffrey J and J Der Channing. Increasing complexity of ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395-1413.
42. Chen R.H, Sarnecki C, and Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk-and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.*1992; 12: 915-927.

43. Sleight Richard G. and Lieberman Michael A.. Chapter 8. Signal Transduction; 119-131.
44. Hordijk PI, Veriaan I, Jalnik K, Van Corven E.J, and Moolenaar W.H. cAMP abrogates the p21^{ras}-mitogen-activated-protein kinase in fibroblasts. *J. Biol Chem* 1994;269:3534-3538.
45. Fruman David A., Meyers Rachel E., Cantley Lewis. Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 481-507.
46. Divecha N and Irvine R.F Phospholipids signaling *Cell.* 80: 269-278.
47. Chan Tung O., Rittenhouse Susan E., and Tsichlis Philip N.. Akt/PKB and other D3 Phosphoinositide-regulated kinases. *Annual Review of Biochemistry.*1999; 68: 965-1014.
48. Vanhaesebroeck B and Waterfiel MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253: 239-254.
49. Domin J, Waterfield. Using structure to define the function of phosphoinositides 3-kinase family members. *FEBS Letters.* 1997; 410:91-95.
50. Coffey Paul J, Jin Jing and Woodgett James R. Protein kinase B(c-Akt): a multifunctional mediator of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochemical Journal* 1998; 335: 1-13.
51. Toker Alex. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Molecular Pharmacology* 2000; 57: 652-658.
52. Duronio Vincent, Scheid Michael and Ettinger Susan. Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell. Signal.* 1998; 10(4): 233-239.
53. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994; 269:5241-5248.
54. Dostal David E., Booz George W. and Baker Kenneth M. Angiotensin II signaling pathways in cardiac fibroblasts: Conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. *Mol Cell Biochem.* 1996; 157:15-21.

55. Braun-Menendez E, Fasciolo C , Leloir LF, Munoz M. The substance causing renal hypertension. 1940. *J Physiology*; 98 : 283-298.
56. Page IH, Helmer OM. A crystalline pressur substance(angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. 1940. *J Exp Med*; 71: 29-42.
57. Saavedra Juan and Timmerman Pieter. *Angiotensin Receptors*. 1994
58. Guyton Arthur and Hall John. *Textbook of Medical Physiology*. Ninth edition. 1996; 227-237.
59. Servant Marc J., Giasson Edith and Meloche Sylvain. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995; 271:16047-16052.
60. Yunzeng Zou, Issei Komuro, Tsutomu Yamazaki, Sumiyo Kudoh, Ryuichi Aikawa, Weidong Zhu, Ichiro Shiojima, Yukio Hiroi, Kazuyuki Tobe, Takashi Kadowaki, Yoshio Yazaki. Cell Type-specific Angiotensin II-evoked signal transduction pathways: Critical roles of $G_{\beta\gamma}$ subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts. *Circ. Res*. 1998; 82:337-345.
61. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT_1 receptor subtype. *Circ. Res*. 1993; 73:413-423.
62. Brilla Christian, Zhou Guoping, Matsubara Luiz, and Weber Karl. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: Response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26: 809-820.
63. Steven A. Fisher and Marlene Absher. Norepinephrine and Ang II stimulate secretion of TGF- β by neonatal rat cardiac fibroblasts in vitro. *Am. J. Physiol*. 1995; 268: C910-C917.
64. Ignatz RA and Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986; 261(9): 4337-4345.

65. Harada Masaki, Itoh Hiroshi, Nakagawa Osamu, Ogawa Yoshihiro, Miyamoto, Kuwahara Koichiro, Ogawa Emiko, Igaki Toshio, Yamashita Jun, Masuda Izuru, Yoshimasa Takaaki, Tanaka Issei, Saito Yoshihiko and Nakao Kazuwa. Significance of Ventricular Myocytes and Nonmyocytes Interaction During Cardiocyte Hypertrophy: Evidence for Endothelin-1 as a Paracrine Hypertrophic Factor From Cardiac Nonmyocytes. *Circulation* 1997 96: 3737-3744
66. Matsubara Hiroaki, Kanasaki Mikihiro, Murasawa Satoshi, Tsukaguchi Yasuyuki, Nio Yutaka, and Inada Mitsuo. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1592-1601.
67. Tsutsumi Yoshiaki, Mastsubara Hiroaki, Ohkubo Naohiko, Mori Yasukiyo, Nozawa Yoshihisa, Murasawa Satoshi, Kijima Kazuhisa, Maruyama Katsuya, Masaki Hiroya, Moriguchi Yasutaka, Shibasaki Yasunobu, Kamihata Hiroshi, Inada Mitsuo, Iwasaka Toshiji. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res.* 1998; 83: 1035-1046.
68. Wollert Kai C., Drexler Helmut. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovascular Research.* 1999; 43:838-849.
69. Opie L.H., MD. Effects of catecholamines on normal myocardium: Implications for the failing heart. *Heart Failure* 1986;104-109.
70. Mycek Mary J., Harvey Richard A., Champe Pamela C., and Fisher Bruce D. 1997 Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology 2nd edition.
71. Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is a alpha-1-adrenergic response. *Clinical Investigation.* 1983; 72: 732-738
72. Long G.S, Hartogenesis W.E, and Simpson P.C. Beta-adrenergic stimulation of cardiac non-myocytes augments the growth-promoting activity of non-myocyte conditioned medium. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 1993; 25: 915-925

73. Boluyt Marvin, Long Xilin, Eschenhagen Thomas, Mende Ulrike, Schmitz Wilhelm, Crow Michael, and Lakatta Edward. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat hearts. *Am.J.Physiol.* 1995; 269: H638-H647
74. Valverde AM, Lorenzo M, Teruel T, Benito M. cAMP inhibits IGF-1-induced mitogenesis in fetal rat brown adipocytes: role of p21 ras. *Exp Cell Res.* 1995; 218:305-309.
75. Cho-Chung YS. On the mechanism of cyclic AMP-mediated growth arrest of solid tumors. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1980; 12:111-121.
76. Williamson EA, Burgess GS, Eder P, Litz-Jackson S, Boswell HS. Cyclic AMP negatively controls c-myc transcription and G1 cell cycle progression in p210 BCR-ABL transformed cells: inhibitory activity exerted through cyclic D1 and cdk4. *Leukemia* 1997; 11:73-85.
77. Crespo P, Cachero TG, Xu N, Gutkind JS. Dual effect of β -adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1995; 270:25259-25265.
78. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DLF, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic factor, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest.* 1998;101:812-818.
79. Alessis DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1995; 270:27489-27494.
80. Price DJ, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer BE. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 1992; 257: 973-977.
81. Calderone A, Oster L, Moreau P, Rouleau JL, Stewart DJ, de Champlain J. Altered protein kinase C regulation of phosphoinositide-coupled receptors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 23:722-728.

82. Pandey Sanjay K., Anand-Srivastava Madhu B, and Srivastava Askok K.. Vanadyl sulfate-stimulated glycogen synthesis is associated with activation of phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of insulin receptor tyrosine phosphorylation. *Biochem.*1998; 37:7006-7014.
83. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharm.* 1995; 47:322-329.
84. James SR, Vaziri C, Walker TR, Milligan G, Downes CP. The turkey erythrocyte beta-adrenergic receptor couples to both adenylate cyclase and phospholipase C via distinct G-protein alpha subunits. *Biochem J.* 1994; 304:359-364.
85. Lazou A, Bogoyevitch M.A, Clerk A, Fuller S.J, Marshall C.J and Sudgen P.H. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascade in adult rat heart preparation in vitro. *Circ Res* 1994; 75: 938-941.
86. Levitzki Alexander. Tyrphostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. *FASEB J.* 1992; 6: 3275-3283.
87. Koroma BM, de Juan E. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells: relationship to the antiproliferative action of genistein. *Biochem Soc Trans.* 1997; 25:35-40.
88. Gazit A, Yaish P, Gilon C, Levitzki A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 1989; 32:2344-52.
89. Arcaro A, Wymann MP. Wortmannin is a potent phosphoinositol 3-kinase inhibitor: role of phosphoinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 1993; 296: 297-301.
90. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by the protein kinase A. *Nature* 1997; 390:88-91.

91. Exton JH. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:481-509.
92. Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH, Plevin R. The regulation of tyrosine kinase signaling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem J.* 1995; 309:361-375.
93. Van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* 1996; 17:698-714.
94. Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:14169-14175.
95. Singh H, Linas SL. Role of protein kinase C in β_2 -adrenoceptor functions in cultured rat proximal tubule epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997; 273:F193-F199.
96. Booz GW, Dostal DE, Singer HA, Baker KM. Involvement of protein kinase C and Ca^{2+} in angiotensin II-induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol.* 1994; 267:C1308-C1318.
97. Del Villar K, Dorin D, Sattler I, Urano P, Robinson N, Mitsuzawa H, Tamanoi F. C-terminal motifs found in ras-superfamily G-proteins: CAAX and C-seven motifs. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24:709-713.
98. Koblán KS, Kohl NE, Omer CA, Anthony NJ, Conner MW, deSolms SJ, Williams TM, Graham SL, Hartman GD, Oliff A, Gibbs JB. Farnesyltransferase inhibitors: a new class of cancer chemotherapeutics. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24:688-692.
99. Yan N, Ricca C, Fletcher J, Glover T, Seizinger BR, Manne V. Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type I malignant phenotype. *Cancer Res.* 1995; 55:3569-3575.

100. Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21^{ras} to the plasma membrane. *Cell* 1990; 63:133-139.
101. Sadoshima J, Izumo S. Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. *Circ Res.* 1995; 77:1040-1052.
102. Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Sleenbergh PH, Sussenbach JS. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997; 272:31163-71.
103. Scott PH, Belham CM, Al-Hafidh J, Chilvers ER, Peacock AJ, Gould GW, Plevin R. A regulatory role for cAMP in phosphatidylinositol 3-kinase/p70 ribosomal S6 kinase-mediated DNA synthesis in platelet-derived-growth-factor-stimulated bovine airway smooth-muscle cells. *Biochem J.* 1996; 318:965-971.
104. Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Science* 1993; 262:1065-1068.
105. Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of ras-dependent activation of raf. *Science* 1993; 262:1069-1072.
106. Monfar M, Lemon KP, Grammer TC, Cheatham L, Chung J, Vlahos CJ, Blenis J. Activation of pp70/85 S6 kinases in Interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-Kinase and is inhibited by cyclic AMP. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:326-337.
107. McKenzie FR, Pouyssegur J. cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (MAPK) inhibition. *J Biol Chem.* 1996; 271:13746-13483.
108. Vaillancourt RR, Gardner AM, Johnson GL. B-raf-dependent regulation of the MEK-1/mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:6522-6530.

109. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Paapin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by ras. *Cell* 1997; 89:457-467.
110. Downward J. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in ras signaling. *Adv. Sec. Mess. Phosphoprotein Res.* 1997; 31:1-10.
111. Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffman BB. α_1 -Adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:8977-8992.
112. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand, Nurnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD, Wetzker R. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 1995; 269:690-694.