

2M11.2821.10

Université de Montréal

**Rôle des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque**

Par

Nadia Abdelaziz

Département de physiologie

Faculté de Médecine

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

Septembre 1999

© Nadia Abdelaziz



W  
4  
158  
2000  
15.122

Université de Montréal

**Rôle des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque**

Presenté par

Nadia Abdelaziz

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Lucie Parent : présidente-rapporteuse

Dr. Angelino Calderone : directeur de recherche

Dr. Pierre Moreau : membre du jury

Mémoire accepté le : 2000-02-08

## SOMMAIRE

Les voies « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) sont d'importantes voies de transmission des signaux de la surface de la cellule au noyau. Elles ont été impliquées dans différents processus cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Chez les mammifères les MAPK sont subdivisées en trois sous familles : «extracellular signal-regulated kinase» (ERK), «c-jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase» (JNK/SAPK) et p38. ERK sont activées par des mitogènes, tandis que JNK et p38 sont essentiellement activées par une variété de facteurs de stress cellulaire. Les mécanismes moléculaires qui régulent l'hypertrophie cardiaque demeurent incertains, cependant l'implication des voies MAPK dans la prolifération de certaines lignées cellulaires permet d'envisager leur importance dans la réponse hypertrophique des cellules du tissu cardiaque. Le but de ce travail est d'étudier la régulation des voies MAPK dans les myocytes cardiaques et d'examiner leur implication dans la réponse hypertrophique. Sur un modèle de culture primaire des myocytes cardiaques isolés des ventricules des rats nouveau-nés, nous avons montré que les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) norepinéphrine (NE) et endothéline-1 (ET-1) ainsi que les promoteurs de tumeurs de la classe des esters de phorbol, phorbol 12,13-dibutyrate (PdBu), stimulent l'activité des voies ERK, JNK et p38 MAPK. Les effets comparés des trois agonistes montrent une puissante activation par PdBu. L'utilisation de PD 98059, un inhibiteur synthétique de MEK («MAP kinase/ERK kinase»), n'affecte pas la synthèse protéique stimulée par NE et ET-1. Un inhibiteur de la voie p38  $\alpha/\beta$  MAPK SB-203580 inhibe l'activité de p38 MAPK stimulée dans les

myocytes cardiaques par NE, mais n'a eu aucun effet sur la synthèse protéique induite par NE, ET-1 et PdBu.

Dans plusieurs lignées cellulaires incluant les fibroblastes cardiaques et les myocytes cardiaques, l'oxyde nitrique (NO) inhibe la prolifération cellulaire. Les effets du NO s'exercent dans les cellules via la stimulation de la guanylate cyclase soluble et la production du second messenger intracellulaire guanosine monophosphate 3'-5' cyclique (GMPc).

Le second objectif de ce mémoire est d'examiner les effets du NO sur la régulation de l'activité de ERK. L'activité des MAPK est régulée à la baisse dans les cellules par déphosphorylation des résidus thréonine et tyrosine par des protéines phosphatases doublement spécifiques dénommées MAPK phosphatases (MKP). Le traitement des fibroblastes cardiaques par un donneur de NO S-nitro-N-acetyl-D, L-penicillamine (SNAP) a stimulé l'expression de MKP-1. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la production de GMPc dans la cellule par le NO pourrait moduler indirectement l'activité de la voie MAPK ERK.

## **TABLE DES MATIERES**

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>iii</b>
<b><u>TABLE DES MATIERES.....</u></b>	<b>v</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xi</b>
<b>DEDICACE .....</b>	<b>xii</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Les voies de signalisations MAPK.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Voies de signalisation de MAPK ERK.....	4
1.1.1.1 MAPK ERK.....	4
1.1.1.2 MAP Kinase kinases (MKK).....	6
1.1.1.3 «MAP kinase kinase kinases» (MKKK).....	7
1.1.1.4 Activation de la voie MAPK EK 1/2 par des récepteurs.....	10
1.1.1.5 Rôles biologiques des voies MAPK ERK1/2.....	13
1.1.2 Voie des MAPK JNK/SAPK.....	13
1.1.3 Voie p38 MAPK.....	15
1.1.4 Conséquences biologiques de l'activation des voies JNK et p38 MAPK.....	18
1.1.5 Régulation des voies MAPK par des protéines phosphatases.....	19
<b>1.2 Hypertrophie cardiaque.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Les changements morphologiques et phénotypiques au cours de l'hypertrophie.....	20
1.2.2 Les stimuli hypertrophiques.....	22
1.2.2.1 Les catécholamines.....	23
1.2.2.2 Endothéline-1 (ET-1).....	24
1.2.2.3 Angiotensine II (AII).....	25
1.2.3 Rôle de la PKC dans l'hypertrophie cardiaque.....	26
1.2.4 Implication des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque.....	27
<b>1.3 La régulation de la voie MAPK ERK1/2 dans les fibroblastes cardiaques.....</b>	<b>28</b>
1.3.1 Rôle de l'oxyde nitrique dans la régulation de l'activité des tyrosines kinases dans les fibroblastes cardiaques.....	29
<b>1.4 Objectif du mémoire .....</b>	<b>31</b>
<b>CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Matériel .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Méthodes .....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Cultures cellulaires.....	34
2.2.1.1 Culture primaire des myocytes cardiaques.....	34
2.2.1.2 Culture des fibroblastes cardiaques.....	35
2.2.2 Traitement des myocytes cardiaques avec des activateurs des voies MAPK ERK, JNK et p38.....	35
2.2.2.1 Séparation des protéines par Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) sur une colonne Mono Q HR 5/5 (PHARMACIA).....	36
2.2.2.2 Séparation sur colonne Mono S HR5/5.....	37

2.2.2.3 Tests de stimulation de l'activité de ERK, JNK et p38 MAPK dans les fractions séparées par FPLC sur colonne Mono Q .....	37
2.2.2.4 Test de stimulation de l'activité de p38 dans les fractions séparées par FPLC sur colonne Mono S .....	38
2.2.2.5 Test de l'activité de ERK par filtre .....	38
2.2.3 Mesures de l'incorporation de la [ <sup>3</sup> H] leucine dans les myocytes cardiaques .....	39
2.2.4 Immunoprécipitation de MAPKAPK-2 .....	39
2.2.5 Isolation des ARN totaux .....	41
2.2.6 Analyse par Northern blot .....	41
2.2.7 Marquage radioactif et hybridation .....	42
2.2.8 Méthodes statistiques .....	42
<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Profil d'activation des voies MAPK par ET-1, NE et PdBu dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés .....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Activation de ERK par PdBu, ET-1 et NE .....	44
3.1.2 Activation de la voie JNK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés traités par ET-1, NE et PdBu .....	50
3.1.3 Activation de p38 MAPK par ET-1, PdBu et NE .....	53
3.1.4 L'activation des voies MAPK ERK ne semble pas être suffisante pour stimuler l'hypertrophie cardiaque observée in vitro dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés .....	58
3.1.5 L'activation de p38 MAPK stimulée par NE, ET-1 et PdBu n'a pas d'effet sur la synthèse protéique des myocytes cardiaques des rats nouveau-nés .....	61
3.1.6 L'activité de p38 stimulée par NE est inhibée par SB-203580 .....	61
<b>3.2 Rôle de NO dans la régulation de la régulation de l'activité de MAPK ERK : Modulation de l'expression de MKP-1 .....</b>	<b>65</b>
3.2.1 NO stimule l'expression de l'ARNm MKP-1 dans les fibroblastes cardiaques des rats nouveau-nés .....	65
<b>CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Discussion .....</b>	<b>70</b>
4.1.1 Rôles des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque .....	70
4.1.2 Modulation de l'expression de MAPK phosphatase-1 (MKP-1) par l'oxyde nitrique ..	75
<b>4.2 Conclusion .....</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>79</b>

## LISTE DE FIGURES

Figure 1.1	Cascades des MAPK	3
Figure 1.2	Voie de signalisation de Ras	8
Figure 1.3	Voie de signalisation par l'intermédiaire des protéines Gi/Gq	12
Figure 1.4	Voie de signalisation par l'intermédiaire des protéines G <sub>i</sub> /G <sub>q</sub>	17
Figure 1.a	Activité de MAPK ERK dans les myocytes cardiaques Des rats nouveau-nés, stimulés par ET-1, NE et PdBu	47
Figure 1.b	Activation de la voie ERK1/2 dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés exposés à NE, ET-1 et PdBu	48
Figure 2	Activation de la voie JNK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés stimulés par ET-1, NE et PdBu	51
Figure 3. a	Activation de p38 MAPK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés stimulés par ET-1, NE et PdBu et séparés par FPLC sur une colonne MONO Q	55
Figure 3. b	Activation de p38 MAPK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés stimulés par ET-1, NE et PdBu et séparés par FPLC sur une colonne Mono S	56
Figure 4	PD 98059 n'affecte pas la synthèse protéique induite par NE et ET-1 dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés	59
Figure 5	SB-203580 n'a pas d'effet sur la synthèse protéique induite par NE, ET-1 et PdBu dans les myocytes cardiaques	62
Figure 6	Effet de NE et de SB-203580 sur l'activité de p38 MAPK dans les myocytes cardiaques	63
Figure 7	SNAP stimule l'expression de MKP-1 dans les fibroblastes cardiaques	66
Figure 8	SNAP induit l'expression de MKP-1 dans les myocytes cardiaques	67

## LISTE DES ABREVIATIONS

AII	: angiotensine II
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ANF	: facteur natriurétique auriculaire («atrial natriuretic factor»)
ARNm	: acide ribonucléique messenger
$\alpha_1$ -AR	: récepteur alpha $\alpha_1$ -adrenergique ( $\alpha_1$ -«adrenergic receptor»)
Ask1	: «apoptosis signal-regulating kinase 1»
ATP	: adénosine 5'-triphosphate
$\beta$ -MHC	: chaîne lourde de la myosine-beta («beta-myosin heavy chain»)
cPLA <sub>2</sub>	: phospholipase A <sub>2</sub> cytoplasmique
DAG	: diacylglycérol
DMEM	: «Dulbecco's Modified Eagles»
DTT	: dithiothréitol
EDTA	: acide éthylènediamine tétraacétique
EGF	: «epidermal growth factor»
EGTA	: «ethylene glycol-bis ( $\beta$ amino ethyl ether) N, N, N', N'-tetra acetic Acid»
ET-1	: endotheline-1
ERK	: «extracellular signal-regulated protein kinase»
FBS	: sérum foetal bovin («Fetal bovin serum»)
FGF	: «Fibroblast growth factor»
FPLC	: «fast protein liquid chromatography»
JNK/SAPK	: «c-jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase/stress-activated protein kinase»
GAPDH	: «glyceraldehyde phosphate deshydrogenase»
GDP	: guanosine 5'-diphosphate
GEF	: «guanine nucléotide exchange factor»
GMPc	: guanosine 3' 5' monophosphate cyclique
GRPC	: recepteur couplé aux protéines G («G protein-coupled receptor»)
GST	: «glutathione-S-transferase»
GTP	: guanosine 5'-triphosphate
HEPES	: N-[hydroxyéthyle] pipérazine-N'-[acide 2-éthanesulfonique]

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	: acide phosphorique
HBSS	: «Hanks Buffered Salt Solution»
Hsp	: protéine de choc thermique («heat choc protein»)
IGF	: «insulin growth factor»
IL-1 β	: interleukine-1 bêta
IP <sub>3</sub>	: inositol triphosphate
KDa	: kilodalton
M	: molaire
MAPK	: «mitogen-activated protein kinase»
MAPKAPK	: «MAPK activated protein kinase»
MBP	: « myelin basic protein »
MEK/MKK	: « MAPK/ERK kinase/MAPkinases »
MEKK/MKKK	: « MEK kinase/MAP kinase kinase kinase »
min	: minute
MKP-1	: «MAPK phosphatase-1»
mM	: millimolaire
μCi	: microCurie
μg	: microgramme
μl	: microlitre
ml	: millilitre
MgCl <sub>2</sub>	: chlorure de magnesium
NaCl	: chlorure de sodium
NaOH	: hydroxide de sodium
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	: orthovanadate de sodium
NE	: norépinephrine
NGF	: «nerve growth factor»
nM	: nanomolaire
NO	: oxyde nitrique
P90 <sup>rsk</sup>	: protéine S6 kinase ribosomale
PAK	: «p21-activated kinase»
PBS	: tampon phosphate salin («Phosphate buffered saline»)

PD 98059	: «[2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphtalen-4-one]»
PdBu	: «phorbol 12, 13 dibutyrate»
PDGF	: «platelet-derived growth factor»
PE	: phénylèphrine
PKC	: protéine kinase C
PKI	: «cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitory peptide»
PLC	: phospholipase C
PMA	: «phorbol 12-myristate 13-acetate»
pmol	: picomole
PMSF	: «phenylmethylsulfonylfluoride»
PTPase	: phosphatase protéin-tyrosine
SB-203580	: [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)imidazole]
SH <sub>2</sub>	: domaine homologue à Src («Src homology domain»)
SNAP	: S-nitro-N-acetyl-D, L-penicillamine
Sos	: «son of sevenless»
TAK 1	: «TGF- $\beta$ activated kinase»
TCA	: acide trichloroacétique
TGF	: «transforming growth factor»
TNF- $\alpha$	:facteur alpha de nécrose tumorale («Tumor necrosis factor-alpha»)
Tris	: tri(hydroxyméthyle) aminométhane
UV	: ultra violet

## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de recherche, Dr Angelino Calderone, pour m'avoir intégré à son équipe, pour ses précieux conseils, pour ses encouragements constants et pour la confiance qu'il m'a témoigné tout au long du projet. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Que le Dr Bruce G Allen, de l'Institut de Cardiologie, trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance. Son expérience et son dynamisme ont constitué un soutien scientifique et moral tout au long de l'année effectuée dans son laboratoire. Tous mes remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Que serait ce travail sans la gentillesse et la disponibilité de Madame Dominique Chevalier. Qu'elle trouve ici l'expression de mes remerciements.

Je voudrais également remercier mes collègues et amis Federico Colombo, Isabelle Mercier et Benoit Boivin. Leur bonne humeur et leur sens de la camaraderie m'ont été très appréciables.

Je dois à Louise Paquette la correction de ce mémoire ainsi que beaucoup de discussion très fructifiantes. Je la remercie pour sa disponibilité et son objectivité.

Un grand merci à mon amie Maria Kotsioprifitis, toujours présente lorsque j'avais besoin de son aide.

Pour conclure, je me dois de remercier mon compagnon Mohamed, pour tout l'amour, la confiance et le soutien moral apportés tout au long de ces deux années de maîtrise.

À mon merveilleux mari Mohamed et à mes adorables garçons Nazim et Rayan,  
avec tout mon amour.

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

## 1.1 Les voies de signalisations MAPK

Les voies de signalisation permettent aux cellules de percevoir les changements du milieu extracellulaire, et d'y répondre de façon appropriée. Les cascades de MAPK sont un des systèmes de signalisation les plus étudiés du fait de leur participation dans divers processus cellulaires incluant la différenciation cellulaire, la division cellulaire et l'apoptose. Les MAPK sont une famille de kinases à sérine/thréonine activées par divers stimuli, comprenant les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs, les hormones, les cytokines, l'osmolarité, les irradiations et d'autres facteurs de stress (1). Elles sont exprimées dans toutes les cellules eukaryotes, et leur organisation sous forme d'un module de trois kinases est conservée au cours de l'évolution de la levure à l'humain. Elles jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression génique et dans les activités cytoplasmiques. Le module MAPK consiste en une «MAPK kinase kinase» (MKKK), une «MAPK kinase» (MKK) et une MAPK. La transmission des signaux est obtenue par une phosphorylation séquentielle, et par l'activation des éléments spécifiques de chaque cascade. Chez les mammifères, 12 gènes MAPK, 7 gènes MKK et 14 MKKK ont été identifiés (1). La famille MAPK (fig 1-1) est constituée de la cascade ERK (1, 2, 3, 4 et 5) qui sont impliquées essentiellement dans les processus anaboliques (différenciation cellulaire, croissance cellulaire et division), JNK/SAPK (1, 2 et 3) et de p38 MAPK  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  activées principalement dans les réponses au stress incluant l'inflammation et l'apoptose (1).

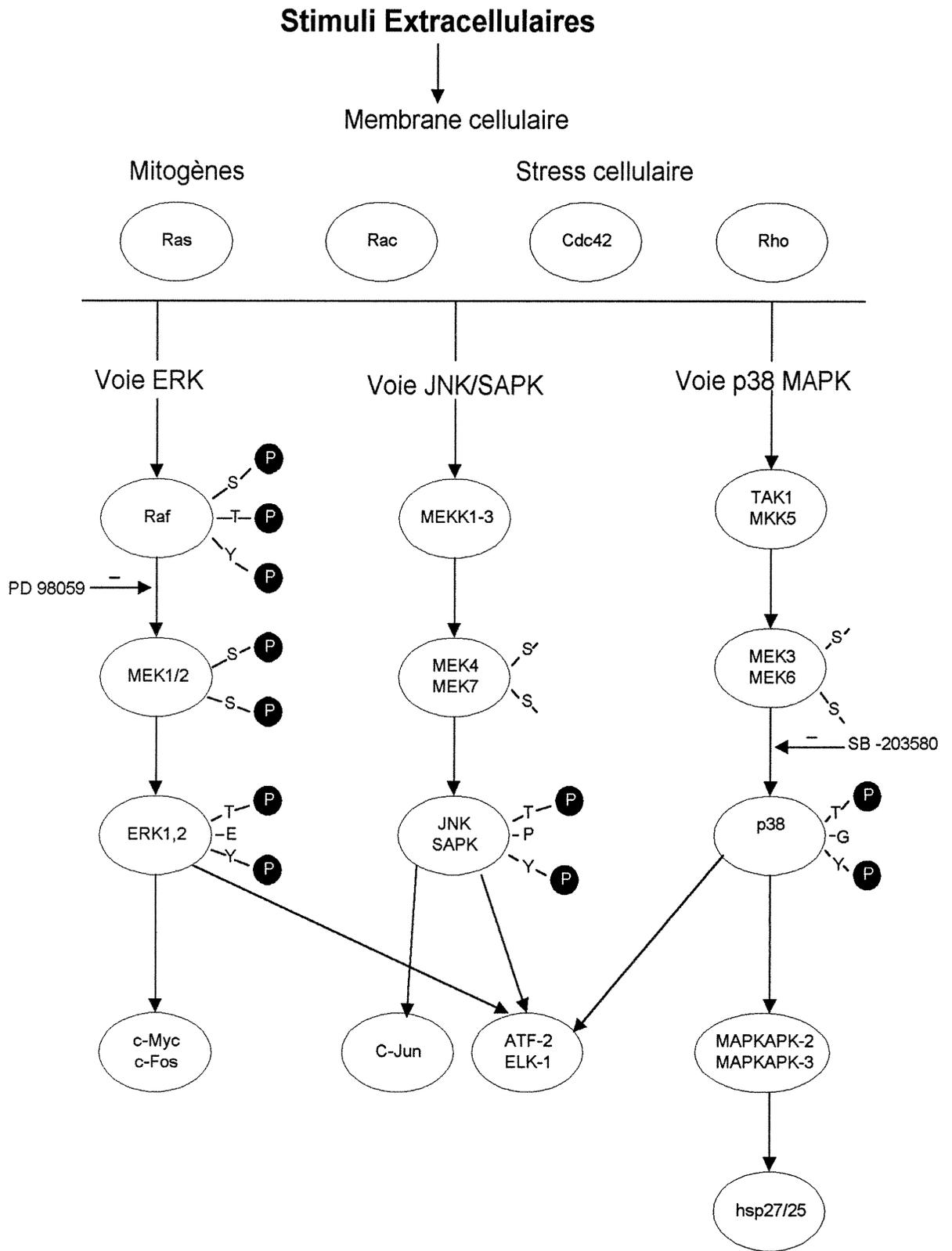


Figure 1.1 Les cascades MAPK

## 1.1.1 Voies de signalisation de MAPK ERK

### 1.1.1.1 MAPK ERK

Les MAPK ERK ont été identifiées au début des années 80 par Cooper et ses collègues qui ont montré que la stimulation par des facteurs de croissance «Platelet-derived growth factor» (PDGF) et «epidermal growth factor» (EGF) de divers types cellulaires induit la phosphorylation sur un résidu tyrosine d'une protéine de 42 KDa (2,3). Durant la même période, Ray et Sturgill ont montré qu'une protéine de 42 KDa, isolée après stimulation par l'insuline de cellules 3T3-L1, était phosphorylée sur des résidus thréonine et tyrosine (4). Peu de temps après, il fut convenu qu'il s'agissait d'une même protéine «mitogen-activated serine/ threonine protein kinase » (5) dont l'activation nécessite une double phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine. En 1990, Boulton et ses collègues ont isolé l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour MAPK p42 et l'ont rebaptisé ERK 1 à cause des nombreux signaux extracellulaires qui stimulent l'activité de cette protéine kinase (6). L'isolation et la purification de ERK 2 et ERK 3 ont été réalisées peu de temps après par la même équipe (7). Deux autres membres de la famille ERK ont été identifiés ERK4 appelée «Immunocross reactive protein» (8), et ERK5 dénommée «Big Molecular weight Kinase» (9). Les kinases ERK1 et ERK2 respectivement de 44 et 42 KDa ont été les plus intensivement étudiés. La cascade ERK consiste en une séquence linéaire de trois kinases à savoir la sous famille Raf des MKKK, «MAP kinase/ERK kinase 1/2» (MEK) sous famille des MKK et de ERK sous famille des MAPK (fig 1-1). Les signaux transmis convergent au niveau de Raf et l'information est transmise par l'intermédiaire de l'amplification de la cascade

ERK par phosphorylation et activation de MEK et de ERK. Une fois activées, ERK1/2 vont phosphoryler un certain nombre de protéines régulatrices situées dans le cytoplasme et dans le noyau. Parmi les substrats des ERK1/2 on reconnaît des protéines cytoplasmiques, incluant la protéine S6 kinase ribosomale ( $p90^{rsk}$ ), la phospholipase  $A_2$  cytoplasmique ( $cPLA_2$ ), la région juxtamembranaire du récepteur EGF et plusieurs protéines associées au microtubule (MAP), MAP-1, MAP-2, MAP-3 et MAP-4 (10,11,12). La phosphorylation de  $p90^{rsk}$  sur thréonine-79 et thréonine-396 contribue à l'activation de la kinase (13). L'activation de la  $p90^{rsk}$  a pour conséquence sa translocation au noyau où elle va phosphoryler un facteur transcriptionnel c-Fos (11). La phosphorylation de la  $cPLA_2$  par ERK1/2 sur sérine-505 (14) va activer cet enzyme qui va catalyser la libération de l'acide arachidonique, un second messenger qui affecte plusieurs processus cellulaires. ERK1/2 peuvent également phosphoryler le récepteur EGF, Raf 1 et MEK 1. Toutes ces protéines sont impliquées dans la voie de signalisation ERK1/2. Leur phosphorylation par ERK1/2, peut représenter un mécanisme de rétrocontrôle pour réguler l'activité des kinases en amont de la voie MAPK ERK1/2. Des études d'immunofluorescences ont démontré que ERK1/2 sont cytoplasmiques dans les cellules quiescentes et sont relocalisées dans le noyau lorsqu'elles sont stimulées par du sérum (15). Cette translocation nucléaire permet à ERK1/2 de phosphoryler des facteurs transcriptionnels incluant Elk1, c-Myc, c-Fos, c-Jun, TAL-1 et ATF-2, indiquant que les voies ERK 1/2 jouent un rôle important dans l'activité nucléaire transcriptionnelle.

### 1.1.1.2 MAP Kinase kinases (MKK)

L'identification de MEK 1 et 2 a été réalisée à l'origine par Ahn et Krebs (16,17). Elles ont été purifiées par la même équipe et par d'autres chercheurs (18). Les deux isoformes qui activent ERK 1 et ERK 2 ont été clonées et exprimées (18,19,20,21). MEK 1 et MEK 2 sont les MKK dans le module MAP kinase ERK 1/2, ce sont des enzymes de 44 KDa, qui présentent 80 % d'identité de séquence. Leur activation nécessite une double phosphorylation sur des résidus sérines (22,23). Une fois activées MEK1/2 vont phosphoryler une séquence Thréonine-Glutamine-Tyrosine (Thr-Glu-Tyr) dans la boucle d'activation du domaine catalytique de ERK1/2 (12). Il semblerait que MEK 1 dans sa forme inactive retienne ERK1/2 dans le cytoplasme. L'activation du module ERK1/2 résulte en la phosphorylation de MEK 1 et l'activation de ERK1/2 permettant ainsi leur dissociation de MEK 1 (1). Une fois activées, ERK1/2 vont aller au noyau où elles seront fonctionnellement séquestrées et pourront ainsi réguler l'activité de protéines nucléaires dont les facteurs transcriptionnels. Après inactivation par des phosphatases, ERK1/2 quittent le noyau et retournent au cytoplasme ou elles se réassocient avec MEK 1 (24). «In vitro», MEK 1 et MEK 2 sont activées par au moins trois membres de la famille Raf incluant A-Raf, B-Raf et Raf-1 (C-Raf). L'activation de MEK 1 par Raf-1 et A-Raf a été démontrée dans des cardiomyocytes traités par des esters de phorbol ou par ET-1 (25). L'activation de MEK 1 par B-Raf a été observée dans des cellules PC-12 stimulées par des facteurs de croissance tels que « Nerve-growth factor » (NGF), EGF et PDGF (26). A-Raf active MEK 1 en réponse à des traitements de cellules Hela par EGF (27). MEK 1 et MEK 2 semblent être activées différemment par A-Raf, B-Raf et Raf-1, dans différents types de cellules et en

réponse à divers stimuli extracellulaires. Un inhibiteur de l'activation de MEK a été commercialisé. Le PD 98095 développé par Alan Salteil et ses collègues de Parke-Davis se lie à la forme inactive de MEK 1 empêchant son activation par Raf et les autres activateurs en amont (28). L'utilisation de PD 98095 a permis de connaître les implications de la cascade ERK 1/2 dans différents processus biologiques.

### 1.1.1.3 «MAP kinase kinase kinases» (MKKK)

**Raf** L'activation des MEK est catalysée par des MKKK. Les membres de la famille Raf ont été reconnus pour leur rôle dans l'activation de ERK1/2. Raf est une famille de protéine kinases à Ser/Thr identifiée comme l'homologue cellulaire normal d'un oncogène viral (v-Raf). Trois isoformes ont été identifiées chez les mammifères, Raf-1 protéine de 74 KDa connue également comme C-Raf, A-Raf et B-Raf, sont des protéines respectivement de 69 et 95 KDa (29). Chez les mammifères toutes les isoformes de Raf présentent beaucoup d'homologie (29). Elles possèdent un domaine régulateur N-terminal et un domaine catalytique C-terminal. La suppression ou la mutation du domaine N-terminal peut rendre Raf oncogénique (30). Raf-1 activée phosphoryle MEK 1 et MEK 2. L'activation de Raf-1 implique son interaction avec la forme active d'une petite protéine de liaison GTP Ras (Ras-GTP) qui est localisée à la surface interne de la membrane plasmique. A l'état basal Ras existe sous la forme inactive Ras-GDP (fig 1-4). L'échange du GDP en GTP permet son activation, et ce processus est stimulé par des facteurs d'échange «guanine nucléotide» (GEFs) tel que «Son of sevenless» (Sos). Raf-1 est cytosolique dans les cellules quiescentes.

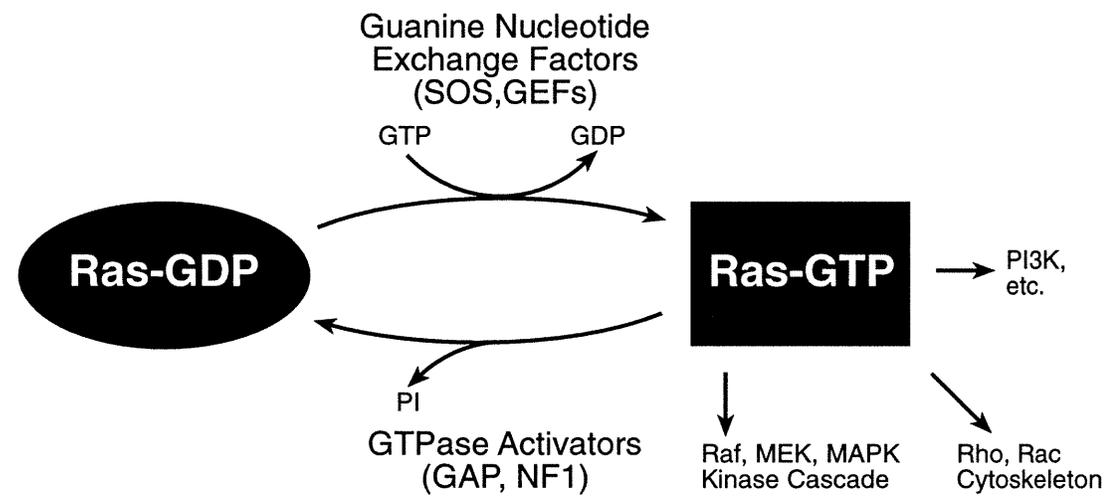


Figure 1-2 Voie de signalisation par Ras

Ras-GTP va permettre la translocation de Raf-1 à la membrane où elle devient active (31, 27). Une fois à la membrane Raf-1 va subir une double phosphorylation sur le tyrosine (Tyr 340 et Tyr 341) par la famille «Src protéine tyrosine kinases» liées à la membrane (27). Cependant la phosphorylation tyrosine, n'est pas entièrement responsable de son activation, puisque la mutation des tyrosines réduit l'activité kinase de Raf-1 mais ne l'élimine pas (27). En plus B-Raf ne possède pas de tyrosines en position 340 et 341, mais peut être activée par Ras (27). Raf-1 est également phosphorylée sur des résidus serine 43, 259, 499, et 621 et sur un résidu thréonine 268 (27). Howe et ses collègues ont montré l'activation de Raf-1 et de ERK1/2 dans des cellules en culture traitées par des esters de phorbol. Ces auteurs suggèrent que la PKC se situe en aval de Ras et en amont de Raf-1 dans la voie de signalisation de ERK1/2 (32). D'autres protéines régulent l'activité de Raf-1 incluant les protéines 14-3-3. Les protéines 14-3-3 sont impliquées dans plusieurs processus biologiques dont le contrôle du cycle cellulaire (33,34). L'association de 14-3-3 avec Raf-1 permet de prolonger son activité en empêchant sa déphosphorylation par des phosphatases (27). Raf-1 peut être également phosphorylée par ERK 1 et ERK 2 qui inhibent l'activité de Raf-1 par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (27,35). Les deux isoformes de Raf, A-Raf et B-Raf possèdent un profil d'expression beaucoup plus restreint (36). B-Raf est constituée de deux sous-unités de 96 et 68 KDa. B-Raf de 96 KDa est exprimée dans les cellules neuronales et neuroendocrines, elle apparaît comme étant l'activateur majeur de MEK dans le cerveau (37). B-Raf de 68 KDa est exprimée dans les fibroblastes et dans d'autres types cellulaires.

#### **1.1.1.4 Activation de la voie MAPK EK 1/2 par des récepteurs**

Différents types de récepteurs peuvent activer la cascade ERK1/2 incluant des récepteurs protéine tyrosine kinases et des récepteurs couplés aux protéines G.

##### **Récepteurs des protéines tyrosine kinases (TKR).**

L'activation de la voie ERK1/2 par des facteurs de croissance tels que EGF, «insulin growth factor» (IGF) et «fibroblast growth factor» (FGF) a été largement étudiée (38). Les récepteurs des facteurs de croissance sont des protéines à un seul domaine transmembranaire possédant une activité intrinsèque «tyrosine kinase». La liaison du ligand au domaine extracellulaire du récepteur «tyrosine kinase», conduit à la dimérisation du récepteur et à son autophosphorylation sur des résidus tyrosines. Les résidus phosphotyrosines du domaine intracellulaire vont servir comme site de liaison de haute affinité pour le domaine «Src homology 2» (SH2) contenu dans les protéines adaptatrices tel que «growth factor receptor-bound protein 2» (Grb2). Grb2 va en retour recruter Sos dans le complexe de signalisation via un domaine SH3 qui permet l'interaction. Sos catalyse l'échange du GDP en GTP sur p21ras, ce qui conduit à l'activation de la voie de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK (39) .

## Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

La grande famille des GPCR inclue les récepteurs d'hormones, de neurotransmetteurs, de substances paracrines et des médiateurs de l'inflammation. Leur principale fonction est de transmettre l'information du milieu extracellulaire vers la cellule, et ceci est permis par leur interaction avec les protéines G hétérotrimériques. Ces récepteurs sont constitués d'une seule chaîne de polypeptides à sept domaines transmembranaires et ils jouent un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire (fig 1-2). Chaque protéine G est constituée de trois sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Sous sa forme inactive la protéine G est liée au GDP par la sous-unité  $\alpha$ . La liaison d'un agoniste au récepteur à la surface de la cellule induit un changement conformationnel dans le récepteur et la protéine G associée. L'activation du récepteur permet la libération du GDP et la liaison du GTP, ainsi que la dissociation de la sous unité  $\alpha$ .  $G\alpha$ -GTP et  $G\beta\gamma$  peuvent alors interagir avec leur effecteur et propager le signal. Quatre sous-familles de protéines G ont été identifiées  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_s$  et  $G_{12/13}$ . Cette identification est basée sur la classification des sous unités  $\alpha$  (40). L'activation par les récepteurs couplés aux protéines G est stimulée par différents agonistes incluant les catécholamines, ET-1, angiotensine II (AII), l'acide lysophosphatidique, le carbachol et la thrombine. La surexpression de mutants actifs  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_o}$  ou  $G_{\alpha_q}$  déficient en GTPase dans différentes lignées cellulaires a permis de montrer l'activation de MKK/ERK (41,42). Certains auteurs ont suggéré que la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine G active Ras, Raf, MEK et ERK, l'activation de Ras s'effectuant par l'intermédiaire de l'interaction de Shc-Grb2-Sos (43,44).

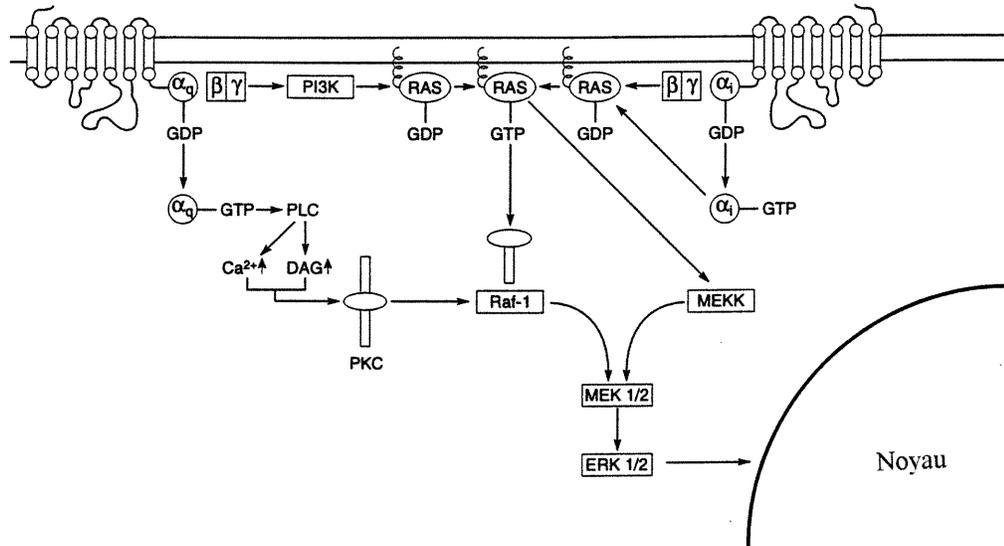


Figure 1-3 Voies de signalisation par l'intermédiaire des protéines G<sub>i</sub>/G<sub>q</sub>

### **1.1.1.5 Rôles biologiques des voies MAPK ERK1/2**

Les voies ERK1/2 sont impliquées dans la prolifération et dans la différenciation cellulaire. ERK1/2 sont activées par des mitogènes dans toutes les cellules (45,46), mais peuvent aussi être activées par des signaux non mitogéniques. Elles sont impliquées dans la prolifération de cellules stimulées par des facteurs de croissance (FGF, PDGF, EGF) interagissant avec des TKR et des agonistes des GPCR. Les principales évidences du rôle des voies ERK1/2 dans la prolifération sont d'une part la relation étroite qui existe entre la synthèse d'ADN et l'activation de ces voies (47) et d'autre part, l'inhibition de l'activité cellulaire de ERK1/2 bloquant la progression dans le cycle cellulaire (48). La stimulation de la synthèse d'ADN par des mutants MEK 1 constitutivement actifs (49,50) et son inhibition par interférence avec un mutant négatif de MEK 1 (49,50) ou par un inhibiteur pharmacologique de MEK (28) sont des éléments en faveur du rôle de ERK1/2 dans la croissance. La voie de signalisation ERK1/2 contribue à la régulation du cycle cellulaire, leur activation a été démontrée dans les phases G<sub>1</sub> et M du cycle (51). L'activation de ERK fournit une protection contre l'apoptose dans différentes lignées cellulaires (52,53). L'activation de la voie ERK1/2 dans les myocytes cardiaques en culture stimulés par des agonistes hypertrophiques tels que ET-1 et FGF, a conduit une équipe de chercheurs à suggérer sa participation dans l'hypertrophie cardiaque (54,55).

### **1.1.2 Voie des MAPK JNK/SAPK**

JNK/SAPK est une protéine de 54 KDa, qui a été identifiée par son activité protéine kinase. C'est une protéine qui présente 40 à 45% d'homologie avec

ERK1/2 (56). Comme pour ERK, SAPK nécessite une double phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine. Une fois activée SAPK va phosphoryler c-Jun sur le site d'activation NH<sub>2</sub> terminal, contrairement aux ERK1/2 qui phosphorylent le site inhibiteur COOH terminal. Le clonage moléculaire a révélé l'existence de trois membres, JNK 1, JNK 2 respectivement de 54 et 46 KDa, et JNK 3 correspondant à SAPK  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (57,58). JNK sont spécifiquement phosphorylés par MKK/MEK 4 et 7 (59, 60). Ces kinases sont activées en amont par des MKKK 1, 2, 3 et 4 (61,62,63). L'ensemble constitue le module MAPK JNK. Dans la plupart des cellules la stimulation de Rac, petite protéine G de la famille Rho probablement activée par Ras, conduit à l'activation de MEKK1, qui active à son tour MKK 4, aboutissant à l'activation de JNK (fig 1-1) (26,58). Les stimuli mitogéniques qui agissent par des récepteurs tyrosine kinases et Ras sont considérés comme étant de faibles agonistes de la voie JNK (57). Les substrats de JNK sont exclusivement des facteurs transcriptionnels incluant c-jun (58), ATF-2 et ELK-1. La phosphorylation de ces facteurs transcriptionnels permet la formation de complexes homo et hétérodimériques (exemple : c-jun interagit avec c-fos pour former le complexe AP-1) (12). Ces complexes régulent l'expression génique, cible de l'activation de la voie de signalisation JNK.

### 1.1.3 Voie p38 MAPK

p38 MAPK a été isolée dans les cellules macrophages stimulées par des endotoxines bactériennes (lipopolysaccharides ou LPS) (64,65). Quatre membres de la famille p38 MAPK ont été clonés et caractérisés. Il s'agit de p38 $\alpha$  (64,66), p38 $\beta_1/\beta_2$  (67,68), p38 $\gamma$  (69,70) et p38 $\delta$  (67,71). Les p38 MAPK ont été identifiées comme étant la cible spécifique des dérivés piridinyle imidazole qui inhibent la production de cytokines proinflammatoires par les monocytes (66). Tous les membres de p38 MAPK sont activés par le stress cellulaire (choc hyperosmotique, UV, choc thermique, LPS), par les cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), et par GPCR (12). L'activation de p38 par le stress ou par des récepteurs à la surface cellulaire, nécessite une phosphorylation séquentielle de protéines kinases du module MAP kinase (MKKK/MKK/MAPK) (fig 1-1). Comme pour les autres MAPK, les p38 sont activées par une double phosphorylation dans la boucle d'activation thréonine-glycine-tyrosine (Thr-Gly-Tyr) (72). Parmi les substrats de p38 MAPK on reconnaît des protéines kinases, MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2) et MAPKAPK-3 (73,74). MAPKAPK-2 et MAPKAPK-3 sont activées et phosphorylées in vitro par p38 et cette activation est inhibée par SB-203580 (75). SB-203580 est un composé piridinyle imidazole (développé par Lee et collègues de SmithKline Beechman), qui inhibe de manière spécifique p38  $\alpha/\beta$  MAPK. MAPKAPK-2 et MAPKAPK-3 vont catalyser la phosphorylation de petites protéines de choc thermique tel que hsp 27/25 (76). Dans les cellules quiescentes hsp27/25 est présente sous la forme d'un agrégat protéique de haut poids moléculaire (77) sa phosphorylation va provoquer la désagrégation de la grosse molécule et son activation. L'activation

protection du cytosquelette (78,79). Un certain nombre de facteurs transcriptionnels sont des substrats potentiels de p38 MAPK incluant Elk-1 et ATF2 (72,80). La régulation de l'activité de p38 MAPK est obtenue par l'activation de petites protéines G de la famille Rho. Comme pour la voie JNK, la coexpression des formes constitutivement actives de Cdc42 et de Rac avec p38 active la voie p38 MAPK (81). Cette activation est indirecte, Cdc42 et Rac activent des protéines sérine et thréonine kinases dénommées p21-activated kinase (PAK) qui vont activer p38 MAPK (82). L'expression de PAK constitutivement active, stimule l'activité de p38 MAPK (83). Comme pour MAPK ERK1/2 et JNK, la voie p38 MAPK est activée par GPCR (fig 1-3). L'activation de p38 a également été observée par la stimulation de récepteurs muscariniques m1 (couplé à  $G_{q/11}$ ) et m2 (couplé à  $G_i$ ) et par des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (couplés à  $G_s$ ) dans des cellules HEK 293 (84). Les protéines kinases en amont de p38 MAPK responsables de son activation directe sont MKK 3 et MKK 6 (85, 12). Ces protéines kinases sont activées par des MKKKs, tak1 et ask1 ou MKK 5 (86,87).

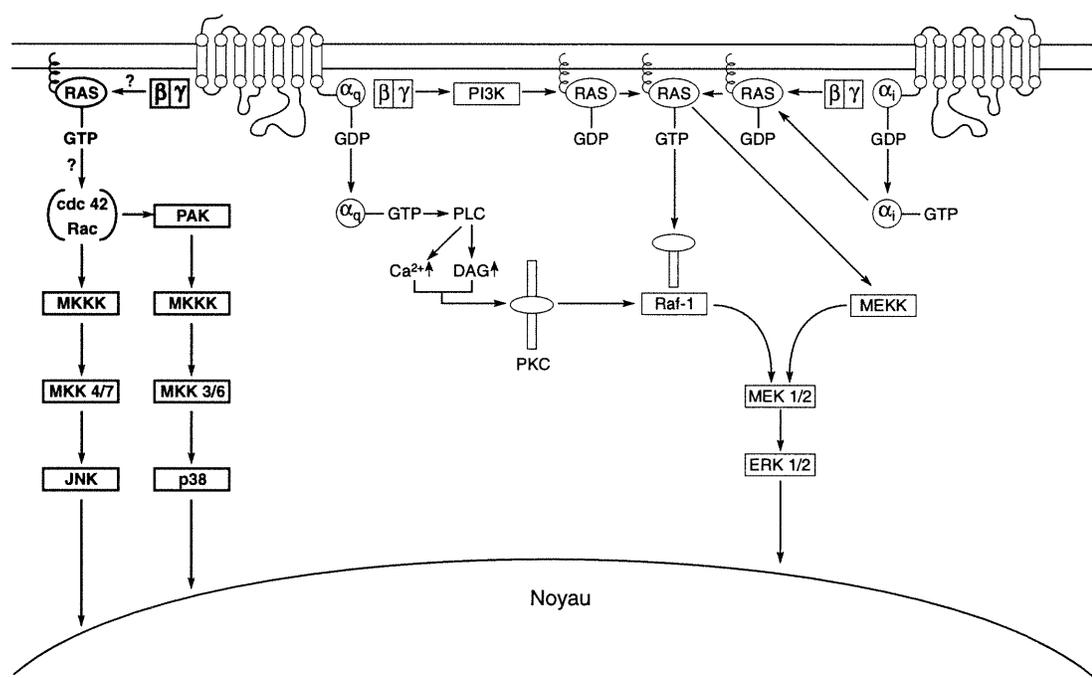


Figure 1-4 Voies de signalisation par l'intermédiaire des protéines  $G_i/G_q$

#### **1.1.4 Conséquences biologiques de l'activation des voies JNK et p38 MAPK**

Il existe une bonne corrélation entre l'activation de JNK et l'apoptose induite par divers stimuli incluant les irradiations UV, les cytokines et les céramides. L'utilisation de composants de la cascade JNK comme mutants dominants négatifs a confirmé le rôle de JNK dans l'apoptose de cellules endothéliales stimulées par des cytokines (88). Cependant, des études menées dans différents laboratoires ont démontré l'implication de JNK dans la prolifération cellulaire (89,90). Cette voie est également activée par l'ischémie/ reperfusion et l'hypoxie dans des cellules rénales (91) et dans les cardiomyocytes (92). L'activation de JNK peut promouvoir différentes réponses prolifératives en fonction du stimulus et du type de cellule. Comme pour la voie JNK, les voies p38 ont été impliquées dans l'apoptose induite dans les cellules PC 12 (52). L'inhibition de l'activité de p38 MAPK par SB-203580 bloque significativement la production de cytokines inflammatoires dans les monocytes en culture (66), ainsi que dans des cellules T hématopoïétiques (93). Dans le système cardiovasculaire, des études sur des cœurs isolés révèlent la stimulation de la voie p38 par l'ischémie et cette activation est maintenue lors de la reperfusion (94,92). L'implication de la voie p38 dans l'hypertrophie cardiaque a été plus récemment étudiée, mais reste controversée. L'utilisation de formes constitutivement actives de MKK3 et de MKK6 activateurs en amont de p38  $\alpha/\beta$  MAPK dans les myocytes cardiaques, a permis de développer les traits caractéristiques de la réponse hypertrophique, incluant l'augmentation de la taille des cellules et de la synthèse des protéines contractiles, ainsi que la

réexpression des gènes des facteurs natriurétiques ANP et BNP et de l'actine  $\alpha$ -squelettique (95,96). Les travaux de Clerk et ses collègues, montrent que l'utilisation de SB-203580 n'empêche pas les changements morphologiques associés à l'hypertrophie des myocytes induite par des agonistes  $\alpha_1$ -adrénergiques ( $\alpha_1$ -R) phényléphrine (PE) et ET-1 (97), ce qui suggère que la voie p38 MAPK ne participe pas à l'hypertrophie des cardiomyocytes en culture. La voie p38 MAPK semble être impliquée dans la régulation du cytosquelette, via la phosphorylation de hsp27 catalysée par MAPKAPK2 (98).

### **1.1.5 Régulation des voies MAPK par des protéines phosphatases**

Une des caractéristiques majeures de la phosphorylation des protéines est la réversibilité. Dans les cellules, il existe un équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation, résultant d'une interaction entre les protéines phosphatases et les protéines kinases. La modification d'une des composantes a un impact d'importance égale sur les voies de transductions du signal. Les protéines phosphatases sont généralement classées en sérine/thréonine ou tyrosine phosphatases, en fonction de la spécificité de l'acide aminé déphosphorylé. Les phosphatases doublement spécifiques sont capables d'enlever les phosphotyrosines et les phosphothréonines à partir des protéines cibles. Leur découverte est relativement récente, mais il existe un nombre croissant de ces phosphatases. Les voies MAPK sont régulées par une famille de phosphatases doublement spécifiques. Ces phosphatases sont toutes apparentées au prototype VH1 du vaccinia virus (99). Parmi ces MAPK phosphatases on reconnaît : MKP-1, MKP-2, MKP-3, MKP-4 et M3/6 (100). Ces phosphatases inhibent l'activité des MAPK par la déphosphorylation des résidus thréonine et

tyrosine. Certaines MKP sont plus sélectives pour leurs substrats, parmi elles on reconnaît MKP-1 et MKP-2 qui sont plus spécifiques pour ERK1/2 (101,102). JNK1 et JNK2 sont également inactivées par MKP-1 et MKP-2 (103) alors que M3/6 est hautement spécifique pour p38 MAPK (104). La spécificité des MKP pour les différents membres MAPK dépend de leur présence durant un événement cellulaire particulier. Les MKP sont presque toutes nucléaires, hormis MKP-3 et MKP-4 (100). Les MKP ne sont pas détectées dans les cellules quiescentes (105), la stimulation par des agonistes incluant les mitogènes, le stress oxydatif, le choc thermique et les irradiations UV, permet leur induction (106). La stimulation des cellules par AII ou par du sérum entraîne l'activation de MKP-1, avec une cinétique correspondante à celle de l'inactivation de ERK1/2 (102,105). MKP-3 et MKP-4 sont impliquées dans la régulation de l'activité cytoplasmique de ERK1 et ERK 2 (104,107). La connaissance des mécanismes qui contrôlent l'induction des MKP, pourrait expliquer comment les voies de signalisations MAPK sont régulées.

## **1.2 Hypertrophie cardiaque**

### **1.2.1 Les changements morphologiques et phénotypiques au cours de l'hypertrophie**

L'hypertrophie cardiaque pathologique est un mécanisme qui permet au cœur de s'adapter à une augmentation de sa charge mécanique due à des changements de pression ou de volume. C'est une réaction physiologique du cœur à une maladie et n'est en soi qu'un phénomène adaptatif. Dans un premier temps

l'hypertrophie des parois ventriculaires permet d'améliorer la fonction pompe des ventricules et de prévenir l'apparition des signes d'insuffisance cardiaque, mais à plus ou moins long terme l'hypertrophie ne suffit plus à maintenir un débit cardiaque normal, c'est la phase dite décompensée (108). Les myocytes cardiaques sont des cellules différenciées qui perdent peu après la naissance la capacité de se multiplier. L'hypertrophie cardiaque se caractérise par la croissance des myocytes sans modification de leur nombre. Deux principaux types d'hypertrophie cardiaque peuvent être distingués, selon qu'ils sont dus à des surcharges de volume ou de pression. Les surcharges de volume ou surcharges diastoliques, au cours desquelles se développe une augmentation du débit cardiaque, se produisent dans l'insuffisance aortique et l'insuffisance mitrale. Les surcharges de pression ou systoliques sont observées dans l'hypertension artérielle (108). Cependant, selon le mécanisme déclencheur (pression ou volume) on observe des différences dans l'aspect morphologique des myocytes. Au cours d'une surcharge en volume les cellules sont allongées avec réplication des sarcomères en séries, ce qui aboutit à une augmentation prédominante du rayon cavitaire et un moindre épaississement pariétal ; c'est le modèle d'hypertrophie excentrique (109,110,111,112,113). Au contraire, l'hypertrophie concentrique apparaît lors d'une surcharge en pression : on observe alors une réplication des sarcomères en parallèle et une augmentation du diamètre des cellules, d'où augmentation de l'épaisseur pariétale par rapport aux volumes cavitaires (109,110,111). Les traits spécifiques de l'hypertrophie cardiaque sont la stimulation de la synthèse protéique qui provoque l'augmentation du nombre d'unités contractiles, ainsi que la modification de l'expression de nombreux gènes cardiaques et l'activation de l'expression de

gènes très précoces (114). La stimulation des myocytes cardiaques par des agents hypertrophiques provoque l'expression rapide et transitoire de gènes très précoces comme les proto-oncogènes (c-jun, c-fos et Egr-1) qui ont été associés dans d'autres types cellulaires avec l'induction de la prolifération et la régulation du cycle cellulaire. Les stimuli hypertrophiques provoquent aussi la réexpression du facteur natriurétique auriculaire (ANF) (115), qui normalement chez l'adulte n'est exprimé que dans les oreillettes. Ceci est commun aux deux modèles d'hypertrophie (116). Certains traits sont spécifiques à l'hypertrophie concentrique (surcharge de pression) tels que la régulation à la hausse des ARNm de l'actine  $\alpha$ -squelettique et de la chaîne lourde de la  $\beta$ -myosine ( $\beta$ -MHC) et la régulation à la baisse de l'ARNm de la calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA-2) (117).

### **1.2.2 Les stimuli hypertrophiques**

On considère qu'un agoniste est hypertrophique lorsqu'il provoque une augmentation de la taille du myocyte, stimule la synthèse des protéines contractiles et l'assemblage des myofibrilles, et induit l'expression génique caractéristique de l'hypertrophie (115). Parmi les premiers facteurs identifiés on reconnaît les agonistes  $\alpha_1$ -AR (NE, PE) (118) et ET-1 (119). D'autres agonistes sont considérés comme étant hypertrophiques incluant l'Ang II (120) et les facteurs de croissance (FGF, IGF). ET-1, les agonistes  $\alpha_1$ -AR et Ang II agissent dans le cœur en se liant aux GPCR, en particulier  $G_q/G_{11}$  (121), tandis que les facteurs de croissance signalent par l'intermédiaire de récepteurs tyrosine kinases (122).

### 1.2.2.1 Les catécholamines

Le système nerveux sympathique agit dans la modulation des fonctions myocardiques. Les catécholamines libérées dans la circulation sanguine exercent leurs actions dans les tissus cardiaques par l'intermédiaire de récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques. Les récepteurs  $\alpha_1$ -AR régulent le rythme cardiaque, la conduction et la force de contraction. Ils participent à la croissance cellulaire en exerçant leurs effets sur l'expression des gènes responsables de la croissance (123,124). Trois types de récepteurs  $\alpha_1$ -AR ont été identifiés selon leurs propriétés pharmacologiques :  $\alpha_{1A}$  (125,126),  $\alpha_{1B}$  (127,128),  $\alpha_{1D}$  (129,130). Des techniques de clonages moléculaires ont permis de classer ces récepteurs parmi les récepteurs à sept domaines transmembranaires (129). Simpson et ses collaborateurs ont montré que la NE via des récepteurs  $\alpha_1$ -AR stimule l'hypertrophie des cardiomyocytes de rats néonataux (118). La stimulation par les agonistes  $\alpha_1$ -AR, active l'expression des gènes très précoces incluant c-myc (131,132), c-jun, c-fos et Egr-1 (119). Les agonistes  $\alpha_1$ -AR activent également l'expression des gènes de l' $\alpha$ -actine squelettique, des chaînes légères de la myosine-2 (MLC-2) et de l'ANF (133,119,126,134). La stimulation par des agonistes  $\alpha_1$ -AR couplés à  $G_q$ PCR active la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) qui va catalyser l'hydrolyse du phosphatidylinositol avec production du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3) (135,136,137,138). Ces deux messagers vont activer la voie de signalisation PKC. L'implication de PKC dans la réponse hypertrophique stimulée par les récepteurs  $\alpha_1$ -AR a été démontrée grâce à l'utilisation des esters de phorbol et des antagonistes de la PKC. La stimulation de PKC par les esters de phorbol augmentent la synthèse des protéines et

induit la réexpression de gènes fœtaux (139,140). De plus, l'inhibition par des antagonistes pharmacologiques bloque la réponse hypertrophique stimulée par les récepteurs  $\alpha_1$ -AR (139,141).

#### 1.2.2.2 Endothéline-1 (ET-1)

ET-1 est un peptide de 21 acides aminés isolé à partir de cellules endothéliales de l'aorte porcine (142). Après clivage d'un large précurseur, ET-1 est libérée à partir de l'endothélium vasculaire ainsi que d'autres cellules incluant les myocytes cardiaques (143). Il agit comme un puissant agent vasoconstricteur. Deux homologues ont été par la suite identifiés, ET-2 et ET-3. Ces peptides peuvent avoir un effet vasodilatateur dans certains lits vasculaires. Deux sous-types de récepteurs ont été identifiés : ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> (144,145). ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sont exprimés dans un grand nombre de tissus, incluant le cœur (146). ET-1 via le récepteur ET<sub>A</sub> va probablement médier l'effet vasoconstricteur sur les cellules du muscle lisse vasculaire, tandis que le récepteur ET<sub>B</sub> va médier l'effet vasodilatateur via la libération de NO et de prostacycline à partir des cellules endothéliales (147). Une étude menée par Hilal-Dandan et ses collaborateurs montre que le récepteur ET<sub>A</sub> est prédominant dans le cœur de rat adulte et qu'il est couplé aux protéines G (G<sub>q</sub> et G<sub>i</sub>) (148). Dans les cardiomyocytes la stimulation par ET-1 couplé aux G<sub>q</sub>PCR induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate (PtdInsP<sub>2</sub>) avec libération de DAG et IP<sub>3</sub> catalysée par la PLC $\beta$ . (149,150,151,54,148). ET-1 stimule également la production de DAG par l'intermédiaire de la phospholipase D (PLD) qui catalyse l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (152). ET-1 induit l'expression génique caractéristique de l'hypertrophie cardiaque incluant l'expression de gènes très

précoces (c-fos, c-jun et Egr-1), la réexpression de l'ANF, de MLC-2, de l'actine  $\alpha$ -squelettique et de  $\beta$ MHC (147). Ces changements transcriptionnels suggèrent que les voies de signalisation Gq-Ras-Raf-MEK-ERK (147) et Ras-MKK1-SEK-JNK (90) puissent jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque.

### 1.2.2.3 Angiotensine II (AII)

La structure de l'AII a été identifiée et synthétisée en 1957 (153). C'est l'effecteur principal du système rénine-angiotensine. L'AII est un peptide de huit acides aminés qui se retrouve dans le sang grâce à l'action de deux enzymes. La rénine est synthétisée dans le rein, puis libérée dans la circulation sanguine où elle va catalyser l'hydrolyse d'un décapeptide biologiquement inactif, l'angiotensine I, par un clivage de la partie amino-terminale de l'angiotensinogène. L'angiotensine I est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'AII agit au niveau de plusieurs types cellulaires tels que la cellule musculaire lisse, les hépatocytes, les cellules glomérulaires du cortex surrénalien, les cardiomyocytes ainsi que les fibroblastes cardiaques. Elle est également connue comme un facteur de croissance qui exerce un effet hypertrophique ou hyperplasique selon le type cellulaire. Des effets hypertrophiques ont été démontrés dans les cellules musculaires lisses aortiques (154,155) ainsi que dans les myocytes cardiaques (156). Des effets hyperplasiques ont été observés dans les fibroblastes cardiaques (156). En plus, AII induit dans les myocytes et les fibroblastes cardiaques l'expression de gènes très précoces (c-fos, c-jun, et Egr-1), la

réexpression des gènes fœtaux de l'ANF et de l'actine  $\alpha$  squelettique ainsi que la régulation à la hausse de facteurs de croissances comme le TGF $\beta$  (157). Les effets de AII sont médiés par l'intermédiaire de deux sous-types de récepteurs pharmacologiquement distincts. Ces deux sous-types de récepteurs nommés AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ont été identifiés en fonction de leur affinité relative pour des antagonistes sélectifs (158). Les deux sous types AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (159,160).

### **1.2.3 Rôle de la PKC dans l'hypertrophie cardiaque**

La PKC fut identifiée en 1977 comme une sérine/thréonine kinase activée par protéolyse (161). Elle est activée de manière réversible par un lipide neutre, le DAG, en présence de phospholipides. L'identification de la PKC comme récepteur principal des promoteurs de tumeurs de la classe des esters de phorbol (qui activent directement la kinase en mimant l'effet du DAG) a fortement stimulé les recherches sur cette protéine et ses voies de signalisation. Depuis le clonage du premier ADNc de PKC en 1986 (162) d'autres clones ont été décrits si bien qu'on regroupe sous le terme de PKC toute une famille d'enzymes jouant un rôle prépondérant au cours de la vie cellulaire, notamment pendant les phases de prolifération et de différenciation. Cette famille d'enzymes consiste en onze isoformes, chacune des isoformes possédant des fonctions biologiques propres. Trois sous-familles ont été identifiées : les PKC classiques ou conventionnelles (cPKC), qui nécessitent le DAG et le calcium pour leur activation, les PKC nouvelles (nPKC), activées par le DAG mais qui ne sont pas sensibles au calcium et les PKC atypiques (aPKC) dont l'activation est indépendante du calcium et du DAG. La liaison de PKC au DAG, va permettre

sa translocation de la fraction soluble cytoplasmique à la membrane où elle va phosphoryler des résidus sérine/thréonine spécifiques sur des substrats qui varient d'un type cellulaire à un autre. L'implication de la PKC dans l'hypertrophie cardiaque a été démontrée grâce à l'utilisation des esters de phorbols, ces derniers induisent une action analogue à celles obtenues par ET-1 et PE (163,164). La stimulation des myocytes cardiaques par des esters de phorbol active la cascade ERK1/2 (165,54), ce qui suggère le rôle de la PKC dans l'activation de la voie ER1/2.

#### **1.2.4 Implication des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque**

Les facteurs hypertrophiques décrits plus hauts (ET-1, agonistes  $\alpha_1$ -AR, AII et les esters de phorbols) activent les voies MAPK. Les kinases qui constituent le module MAPK ERK1/2 (Raf, MEK et ERK) sont fortement activées dans les myocytes cardiaques par les agonistes couplés à  $G_q$ PCR, par phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et par les facteurs de croissance (FGF) (165,25,166,167,157). Dans les myocytes cardiaques la voie JNK est puissamment activée par le choc hyperosmotique (89), mais le plus surprenant a été de constater la stimulation de l'activité des voies JNK et p38 MAPK par les agonistes couplés à  $G_q$ PCR (167,97). La corrélation entre l'activation des voies MAPK et le développement de la réponse hypertrophique a stimulé de nombreuses recherches (165,166,168,169,170,90,171,97,96). Cependant les résultats obtenus par les différentes équipes de chercheurs demeurent controversés.

### **1.3 La régulation de la voie MAPK ERK1/2 dans les fibroblastes cardiaques**

Le tissu cardiaque est composé de cardiomyocytes et d'autres types de cellules incluant les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Les fibroblastes cardiaques constituent les deux tiers de la population cellulaire du cœur, bien que les myocytes occupent 80% du volume cardiaque. Lorsque le cœur est soumis à différents stress tels qu'une surcharge en pression (HTA) ou un infarctus du myocarde, les myocytes cardiaques s'hypertrophient tandis qu'on observe une hyperplasie des fibroblastes avec production excessive de protéines de la matrice extracellulaire (collagènes et fibronectines) aboutissant à une fibrose interstitielle. Cette prolifération pathologique des fibroblastes cardiaques constitue un des signes majeurs du remodelage ventriculaire gauche responsable du dysfonctionnement cardiaque. Plusieurs études «in vivo» et «in vitro» ont démontré le rôle majeur de l'AII dans la régulation de la prolifération des fibroblastes ainsi que le développement de la fibrose interstitielle (172,173,174). L'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, prévient l'accumulation de collagène et la synthèse d'ADN (175). L'action de l'AII est médiée via le récepteur AT<sub>1</sub>, car le traitement par des antagonistes de ce récepteur (Losartan), inhibe complètement la synthèse de collagène (176). Dans des cellules en culture L'AII, via son récepteur AT<sub>1</sub> couplé aux protéines G (G<sub>i</sub>/G<sub>q</sub>) active la voie de signalisation MAPK ERK1/2 (177,178). Dans notre laboratoire nous avons obtenu l'activation de la voie MAPK ERK1/2 dans les fibroblastes cardiaques des rats nouveau-nés stimulés par l'AII et par l'isoprotérenol un agoniste β-adrénergique (200). Les

événements moléculaires responsables de l'hyperplasie des fibroblastes ne sont pas encore connus, le rôle de la voie des MAPK ERK dans ce processus demande à être clarifié.

### **1.3.1 Rôle de l'oxyde nitrique dans la régulation de l'activité des tyrosines kinases dans les fibroblastes cardiaques**

L'oxyde nitrique (NO) est un gaz qui diffuse librement à travers les membranes des cellules cibles pour activer la formation de GMPc. Depuis sa mise en évidence en 1980 par Furchgott et al (179), nous savons qu'il est devenu un effecteur biologique essentiel dans de multiples fonctions physiologiques. Le NO est synthétisé dans les cellules endothéliales à partir d'un acide aminé, la L-arginine, sous la dépendance d'une famille d'enzymes; les NO-synthases (NOS). NO exerce la majeure partie de ses effets physiologiques via l'activation de la guanylate cyclase soluble et la production concomitante de GMPc (180). Dans le cœur NO, dérivé de l'endothélium ou généré par les cardiomyocytes, diminue la contractilité de ces cellules (181). Le rôle de NO dans l'inhibition de la croissance cellulaire a dans un premier temps été démontré dans les cellules musculaires lisses aortiques (182). L'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses de l'aorte de rats nouveau-nés a également été observée en présence de NO et d'autres agents qui augmentent la production de GMPc intracellulaire (ANF, 8-bromo-GMPc), de plus cet effet avait pour corollaire l'augmentation de l'activité de «protéine tyrosine phosphatase» (PTPase) et la déphosphorylation de la protéine phosphotyrosine (183). Une étude plus récente démontre l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés stimulés par NE, par un donneur de NO

(SNAP), l'ANF et par une substance analogue au GMPc (8-bromoGMPc), qui tous activent le système GMPc (184). Jusqu'à présent, le mécanisme par lequel agit GMPc sur la prolifération cellulaire n'est pas encore connu. Les MAPK ont été impliquées dans la croissance et la différenciation de plusieurs types cellulaires. Comme toutes les MAPK, l'activité de ERK 1/2 est régulée par une phosphorylation réversible des résidus tyrosine et thréonine indiquant que les protéines phosphatases jouent un rôle important dans le contrôle de l'activité enzymatique. Des études récentes ont démontré que l'inactivation de la signalisation des MAPK était médiée par une classe de protéines phosphatases doublement spécifiques incluant MKP-1. MKP-1 est la plus étudiée de ces phosphatases, elle possède une double activité catalytique envers le contenu protéique en phosphotyrosine et phosphothréonine, elle a été impliquée dans l'inhibition de ERK1/2 et de JNK par rétro contrôle, après stimulation par des mitogènes (101,103) et par des facteurs de stress cellulaires (185). Les effets du NO dans l'inhibition de la prolifération pourraient s'exercer via la régulation de l'activité des MAPK en stimulant l'expression de MKP-1.

## 1.4 Objectif du mémoire

Le but général de cette étude était d'une part d'identifier quelles voies MAPK sont activées au cours de l'hypertrophie des myocytes cardiaques en culture, stimulés par des inducteurs de l'hypertrophie comme NE, ET-1 et PdBu. D'autre part d'explorer la participation d'une ou de plusieurs de ces voies au processus hypertrophique, en étudiant les effets d'inhibiteurs spécifiques tels que PD 98059 inhibiteur de MEK ou SB-203580 inhibiteur de p38  $\alpha/\beta$  MAPK, sur la synthèse protéique provoquée par les stimuli hypertrophiques.

Une partie de ce travail a consisté à examiner l'effet du NO sur la modulation de l'expression de MKP-1, dans les fibroblastes cardiaques en culture.

## CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.1 Matériel

Le milieu de culture des cellules Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) , le sérum bovin fœtal (FBS), la trypsine, le Hanks Buffer Salt Solution (HBSS) et la collagénase proviennent de chez GIBCO BRL (Burlington, Ontario, Canada). Les boîtes de pétri ont été acquises chez Falcon; Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes NJ). L'insuline, la transferrine et le sélénite de sodium ont été achetés chez Collaborative Biomedical (Bedford, MA, USA). Le [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP et l' [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP proviennent de chez Amersham International. Le Triton X-100, la leupeptine et le PMSF proviennent de chez Roche Molecular Biochemicals. Les substrats MBP, c-jun et hsp 27 ont été gracieusement offerts par le Dr. Bruce Allen de l'Institut de Cardiologie de Montréal. L'anticorps MAPKAPK-2 (Goat polyclonal IgG) et la protéine A/G agarose, proviennent de chez Santa Cruz Biotechnology Inc. La [ $^3$ H] leucine provient de chez ICN Biomedical Inc (Costa Mesa, CA). NE et PdBu ont été achetés chez Sigma (St. Louis). Le PD 98059 provient de chez Biomol (Plymouth Meeting, PA). La microcystine LR, SB-203580 et ET-1 proviennent de chez Calbiochem (Lajolla, CA). Les réactifs d'électrophorèse, de transfert d'ARN et pour le test de Bradford ont été obtenus chez Les laboratoires Bio-Rad, Canada LTD, (Mississauga, Ontario). La sonde d'ADNc MKP-1 a été gracieusement fournie par le Dr Lester Lau du département de génétique Université de Chicago. La sonde de ADNc GAPDH provient de chez American Type Culture Collection (Rockville, MD). Les membranes de nitrocellulose ont été achetées chez Genescreen Plus (Dupont-NEN, Canada). Le papier Wathman P-81 a été obtenu de chez WWR-Calab Mont-Royal, Québec).

## **Les rats**

Les rats nouveau-nés Sprague-Dawley âgés de un à trois jours ont été achetés chez Charles-River Canada (St Constant, Québec).

## **2.2 Méthodes**

### **2.2.1 Cultures cellulaires**

#### **2.2.1.1 Culture primaire des myocytes cardiaques**

Les myocytes cardiaques ont été isolés à partir des ventricules de rats nouveau-nés Sprague-Dawley âgés de un à trois jours. Les animaux ont été anesthésiés à l'éther, puis décapités. Les cœurs ont été enlevés et les ventricules ont été séparés des oreillettes, puis découpés avant d'être digérés par 0,1% de trypsine contenue dans une solution tampon dépourvue de calcium et de magnésium (HBSS). La digestion des tissus a été effectuée durant la nuit à 4°C. Le lendemain, l'action de la trypsine a été neutralisée par l'action du sérum bovin foetal (7% FBS) contenu dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Les tissus ont été de nouveau digérés, cinq fois de suite dans 10 ml de 0,1% collagénase contenue dans du HBSS. Après chaque digestion, les suspensions cellulaires ont été collectées puis centrifugées à 1000 g à 4° C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans DMEM enrichi de 7 % de FBS. Les cellules ont été par la suite incubées durant 45 min dans des flacons T75 à deux reprises pour favoriser l'attachement des fibroblastes au fond du flacon et enrichir ainsi les cultures en myocytes. Les myocytes ont étéensemencés dans des pétris de 100 mm  $2 \times 10^6$  cellules/ boîte de pétri dans du milieu DMEM enrichi de 7% de

sérum. Après 24h, le sérum a été enlevé, et les cellules ont été lavées avec du DMEM pour enlever le sérum résiduel et les cellules non adhérentes. Le sérum a été remplacé par du DMEM contenant 5 mg/ml d'insuline, 5 mg/ml de transferrine et 5 ng/ml de sélénite de sodium.

### **2.2.1.2 Culture des fibroblastes cardiaques**

Les fibroblastes cardiaques ont été isolés à partir de rats nouveau-nés Sprague-Dawley, comme décrit plus haut. Après avoir séparé les myocytes des autres lignées cellulaires, les cellules adhérentes représentées en majorité par des fibroblastes ont été cultivées dans du DMEM contenant 7% de FBS. Après 5 à 7 jours les cellules étaient confluentes, elles ont été séparées des autres lignées cellulaires par 0,25% de trypsine. Les fibroblastes cardiaques ont étéensemencés dans des pétris de 100 mm à une densité de 100 cellules/mm<sup>2</sup>, dans un milieu DMEM enrichi de 7% de FBS. Après 48h, le milieu a été aspiré, les cellules ont été lavées avec un tampon phosphate salin (PBS pH 7,4 à 4°C), puis cultivées dans du DMEM contenant 5 mg/ml d'insuline, 5 mg/ml de transferrine et 5 ng/ml de sélénite de sodium.

### **2.2.2 Traitement des myocytes cardiaques avec des activateurs des voies MAPK ERK, JNK et p38.**

Les myocytes cardiaques ont été traités par les agonistes hypertrophiques, 10 nM ET-1 ou 1 µM NE ou 100 nM PdBu pendant 5 min, ce qui correspond au temps maximal d'activation de ERK et cela quel que soit l'agoniste utilisé. Les cellules ont été ensuite lavées avec du PBS (pH 7.4 à 4°C), puis lysées par un tampon composé de 10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM

EGTA, 50 mM NaF, 20 mM  $\beta$ -glycérolphosphate, 0,5 mM PMSF, 1 mM orthovanadate de sodium ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 1% Triton x-100, 0,5% nonidet P40, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptine, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinine et 1  $\mu\text{M}$  microcystine LR. Les lysats de cellules ont été collectés puis centrifugés à 10,000 g à 4°C pendant 10 min. Les surnageants ont été congelés à -80° C. La concentration de protéines a été mesurée par la méthode de Bradford (186).

#### **2.2.2.1 Séparation des protéines par Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) sur une colonne Mono Q HR 5/5 (PHARMACIA).**

Ces colonnes sont conçues pour séparer les protéines, les peptides, les polynucleotides et autres biomolécules selon leurs charges ioniques respectives, de façon rapide et avec un très haut niveau de résolution. La colonne Mono Q est une colonne échangeuse d'anions, l'addition d'un lysat contenant des protéines de charges négatives déplace les charges négatives faiblement liées. Les lysats protéiques (500  $\mu\text{g}$ ) ont été filtrés puis centrifugés avant d'être injectés dans la colonne Mono Q. La colonne a été équilibrée avec un tampon A (50 mM Tris HCl pH 7,5 à 5°C, 20 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5% (v/v) glycérol, 0.03% (v/v) Brij, 1 mM benzamidine, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  leupeptine, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , et 0.1%(v/v) 2-mercaptoethanol). Après un lavage isocratique, les protéines ont été éluées dans un tampon B (tampon A + 1.0 M NaCl) selon un gradient linéaire de NaCl (0-0.8M) à un débit de 0,4 ml/min. Soixante fractions de 0,5 ml ont été collectées.

### 2.2.2.2 Séparation sur colonne Mono S HR5/5.

Cette technique de purification est plus spécifique pour l'activité de MAPKAPK-2 (substrat de p38 MAPK). La colonne Mono S est chargée positivement, elle a permis de séparer les protéines qui se trouvaient dans les 8 premières fractions de la Mono Q, celles qui ne font pas de liaison avec la colonne Mono Q à cause de leurs charges positives ou neutres, plus les protéines contenues dans le liquide de lavage. Elle a été équilibrée avec un tampon A (25 mM Hepes pH 7,5 à 5°C, 20 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5% (v/v) glycérol, 0,03% (v/v) Brij, 1 mM Benzamidine, 1  $\mu$ g/ml leupeptine, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  et 0,1% (v/v) 2-mercaptoethanol). Après un lavage isocratique, les protéines ont été éluées dans un tampon B (tampon A +1.0 M NaCl) par un gradient de NaCl (0-0.4 M) à un débit de 0,4 ml/min. soixante-dix fractions de 0.5 ml ont été collectées.

### 2.2.2.3 Tests de stimulation de l'activité de ERK, JNK et p38 MAPK dans les fractions séparées par FPLC sur colonne Mono Q

L'activité enzymatique de ERK, JNK et MAPKAPK-2 (substrat de p38 MAPK) a été testée par la mesure de leur capacité à phosphoryler leurs substrats respectifs MBP, c-jun et hsp27. Cette activité a été mesurée dans des échantillons contenant 20  $\mu$ l de chaque fraction protéique (1-50) en présence de 0,5 mg/ml de MBP, ou 0.01  $\mu$ g/ml GST-c-jun ou 0.01  $\mu$ g/ml GST-hsp 27 10  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (3,3 Ci/mmol), 1.3 mM EDTA, 1.3 mM EGTA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu$ M PKI, 10 mM DTT, 10  $\mu$ g/ml leupeptine, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . La réaction a débuté par l'addition de 10  $\mu$ l du tampon de kinase 3 x, elle a été mise à 30°C pendant une

heure puis stoppée par l'addition de 10  $\mu$ l d'un tampon d'échantillonnage Laemmli (187) 4  $\times$  (0,05 M Tris HCl pH 6,8, 0,5 M (v/v) 2-mercaptoethanol, 0,5 M sucrose, 1,0 M EGTA, 0,008% bleu de bromophenol). Les échantillons sont portés à ébullition pendant 90 secondes. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à gradient 10/20%. Elles ont été visualisées par coloration du gel avec du bleu de coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250). L'addition de  $^{32}$ P sur hsp 27 a été quantifiée par phosphor-imaging (Bio-Rad GS 525 Molecular analyser) et autoradiographie (Kodak BioMax MR).

#### **2.2.2.4 Test de stimulation de l'activité de p38 dans les fractions séparées par FPLC sur colonne Mono S.**

Le même procédé de stimulation de l'activité de p38 a été utilisé dans les fractions obtenues après séparation sur colonne MONOS. Le même substrat a été utilisé 0,01  $\mu$ g/ml hsp 27.

#### **2.2.2.5 Test de l'activité de ERK par filtre.**

L'activité de ERK a été mesurée par la méthode suivante. 20  $\mu$ l de chaque fraction obtenue dans la Mono Q ont été combinés à 10  $\mu$ l d'un tampon de kinase 3 $\times$ l (0,5 mg/ml MBP, 0,1 mM ATP[ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (50 à 100cpm/pmol), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0  $\mu$ M PKI, 10 mM DTT, 10  $\mu$ g/ml leupeptine, 1  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Après incubation de une heure à 30°C, la réaction a été arrêtée en mettant 25  $\mu$ l de chaque échantillon sur des carrés de 1.5  $\times$  1.5 cm de papier Whatman P-81 qui ont été immédiatement immergés dans une solution de 0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Après trois lavages de 20 min, la radioactivité incorporée a été mesurée dans un compteur à scintillation  $\beta$  (Beckman).

### **2.2.3 Mesures de l'incorporation de la [<sup>3</sup>H] leucine dans les myocytes cardiaques**

Ces expériences permettent de mesurer la croissance cellulaire par la mesure de l'incorporation de la leucine marquée au tritium qui est l'index de la synthèse protéique. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de pétri 24 puits pendant 24h dans un milieu DMEM enrichi de 7% de FBS, le sérum a été remplacé par du DMEM pour 48 h. La densité cellulaire utilisée était de 100-200 cellules/mm<sup>2</sup>. Les cardiomyocytes isolés à partir des ventricules des rats nouveau-nés ont été prétraités 15 min avec l'inhibiteur de MEK 50 μM PD 98059 ou avec l'inhibiteur de p38 MAPK 10 μM SB-203580, avant d'être stimulés par 1 μM NE ou 10 nM ET-1 ou 100 nM PdBu pendant 24 heures en présence de 2 μCi/ml de [<sup>3</sup>H] leucine. Après 24 h de stimulation, les cellules ont été lavées à deux reprises avec du PBS (pH 7,4 à 4° C), puis incubées 30 min dans 5% d'acide trichloroacétique froid (TCA) pour précipiter les protéines. Les lysats protéiques ont été lavés deux fois de suite avec de l'eau froide puis solubilisés dans 0.4 M NaOH. Les aliquots ont été comptés dans un compteur à scintillation β (Beckman).

### **2.2.4 Immunoprécipitation de MAPKAPK-2**

Les myocytes cardiaques maintenus en culture pendant 48 h dans du DMEM sans FBS, ont été traités pendant 15 min par l'inhibiteur de p38 10 μM SB-203580. Les cellules ont été stimulées 5 min par l'addition de 1 μM de NE au milieu de culture. Après stimulation par l'agoniste, les cardiomyocytes ont été rapidement lavés deux fois de suite avec du PBS (pH 7,4, 4°C), puis lysés dans

un tampon contenant 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM Naf, 20 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 0,5 mM PMSF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Triton x-100, 0,5% nonidet P40, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de leupeptine et 1  $\mu\text{g}$  d'aprotinine. La concentration des protéines a été mesurée par la méthode de Bradford. Des échantillons ont été préparés contenant 0,5  $\mu\text{g}$  d'anticorps (AC) MAPKAPK-2 et 20  $\mu\text{l}$  d'une suspension de 50% de protéine A/G agarose puis incubés pendant 2 à 3h à 4°C. Après incubation, quatre lavages ont été effectués avec 500  $\mu\text{l}$  de TBST (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), suivi de trois lavages avec un tampon de lyse (25 mM (Tris HCl pH 7,5, 10 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 20 mM Naf, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1,0 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM benzamidine, 0,5 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptine, 5 mM DTT, 1% Triton x-100 et 1  $\mu\text{M}$  microcystine LR). Après les différents lavages 50  $\mu\text{g}$  de lysats protéiques ont été incubés avec le complexe AC-protéine A/G Agarose dans un rotateur clinique à 4°C pour la nuit. Les immuno-complexes ont été resolubilisés dans un tampon de kinase contenant 1  $\mu\text{g}$  GST-hsp27, 30  $\mu\text{M}$  ATP, 1,0 mM EGTA, 5  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$  PKI, 10 mM DTT, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptine et 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Après une heure à 30°C, la réaction a été stoppée par l'addition d'un tampon d'échantillonnage Laemmli 2x. Les échantillons ont été bouillis pendant 90 sec, puis séparés par un gel d'électrophorèse SDS 15% acrylamide. L'addition de  $^{32}\text{P}$  sur hsp 27 a été quantifiée par phosphor imaging et par autoradiographie.

### **2.2.5 Isolation des ARN totaux**

Les fibroblastes cardiaques ont été cultivés dans des pétris-100mm dans du DMEM enrichi de 7% de FBS. Après 24h le milieu a été remplacé par un milieu sans sérum pour 48h. La densité cellulaire utilisée était de 100 cellules/mm<sup>2</sup>. Les fibroblastes ont été traités par 100 µM SNAP à la température de la pièce pour 15, 30, 60 ou 120min. Les ARN totaux ont été extraits avec le Guanidium Thiocyanate comme décrit dans la méthode de (188). Les ARN totaux ont été dénaturés par une solution contenant 4 M/L guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0,5% laurylsarcosine et 0,1 M 2-mercaptoethanol pH 7,0.

Les myocytes cardiaques ont étéensemencés dans des pétris-100 mm. La densité cellulaire utilisée était de 300 à 400 cellules/mm<sup>2</sup>. Après 24h dans du DMEM enrichi de 7% de FBS, puis 48 h dans du DMEM sans FBS, les cardiomyocytes ont été stimulés par 100 µM SNAP à la température de la pièce pour 15, 30 ou 60 min. Les ARN totaux ont été extraits par la méthode de Chomczynki, comme décrit plus haut.

### **2.2.6 Analyse par Northern blot**

Des quantités égales d'ARN totaux (15 µg) en présence de 2,2 M formaldéhyde et 50% formamide, ont été dénaturés à une température de 65° C durant 15 min. Par la suite les ARN totaux ont été fractionnés par électrophorèse dans un gel de 1,3% agarose contenant 4% formaldéhyde. Les ARN ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose par un appareil de transfert. Les ARN ont finalement été fixés à la membrane par rayons ultraviolets (Amersham Pharmacia).

### **2.2.7 Marquage radioactif et hybridation**

La sonde d'ADNc MKP-1 de rat a été radiomarquée avec [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP pour obtenir une activité spécifique de  $1-2 \times 10^6$  cpm /ng d'ADNc. Les membranes ont été hybridées pendant 18-24h à 42°C. Les membranes ont été lavées à deux reprises pendant 15 min à la température de la pièce avec une solution contenant 300 mM NaCl / 30mM trisodium citrate (pH 7) et 0,1 % SDS, puis deux fois pendant 15 minutes à 65°C avec 30mM NaCl/3 mM citrate trisodium et 0,1% SDS. Les membranes ont été exposées sur des films Kodak XAR-5 à -80°C, pour 2 à 3 jours. Les films ont été analysés par densitométrie au laser (Chemilmager 4000 I v4.04 software; Alpha innotech). La taille des messages hybridés a été estimée en utilisant les bandes 18S et 28S comme standards. Les résultats ont été normalisés en utilisant une sonde radioactive codant pour un gène très stable le « glycéraldehyde phosphate déshydrogénase » (GAPDH).

### **2.2.8 Méthodes statistiques**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et d'erreurs-types (S.E.M.). Les différences entre les moyennes ont été évaluées par un test-t de Student bilatéral pairé. Les différences entre les moyennes dont le degré de probabilité d'erreur de type  $\alpha$  est inférieur à 0,05 ( $p < 0,05$ ) sont considérées comme étant statistiquement significatives.

## CHAPITRE 3 RÉSULTATS

### **3.1 Profil d'activation des voies MAPK par ET-1, NE et PdBu dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés**

Au cours de cette étude nous avons voulu examiner l'implication des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque sur un modèle de culture primaire des myocytes cardiaques des ventricules des rats nouveau-nés. Notre objectif était d'une part de déterminer quelles étaient les voies MAPK activées au cours de l'hypertrophie après stimulation des cellules par trois facteurs hypertrophiants ET-1, NE et PdBu. D'autre part de comparer la puissance des agonistes utilisés sur l'activité de ces kinases, et finalement d'examiner l'implication de ces voies dans la croissance des cardiomyocytes.

#### **3.1.1 Activation de ERK par PdBu, ET-1 et NE.**

Plusieurs études ont démontré l'activation des voies MAPK ERK1/2 au cours de l'hypertrophie des myocytes cardiaques stimulés par divers facteurs incluant les agonistes des GPCR (PE, epinéphrine et ET-1) et les esters de phorbol (165,166,168,169). Nous avons voulu explorer davantage les effets de ces différents agonistes en comparant leurs effets sur la stimulation de l'activité des MAPK ERK 1/2, dans les myocytes cardiaques isolés à partir des ventricules des rats nouveau-nés. Les cellules ont été traitées 5 min par 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 ou 100 nM PdBu. Les lysats protéiques ont été séparés par FPLC sur une colonne Mono Q, et des tests de l'activation des MAPK ont été effectués. Nous avons pratiqué deux séries d'expériences, et obtenu des résultats similaires. L'analyse des résultats est réalisée à partir de l'ensemble de nos résultats, mais les figures

présentées dans cette étude (figures 1-3) proviennent d'une seule série d'expériences. Les trois agonistes ont tous activé la voie ERK. Le PdBu stimule très fortement l'activité de ERK, des pics de phosphorylation de MBP sont détectés dans quatre fractions, un pic majeur élué à 128 mM NaCl (fraction 26 figure 1a) et trois pics de même amplitude ont été élués à des concentrations de NaCl respectives de 240 mM, 280 mM et 300 mM (fractions 30, 35 et 37, fig 1a). L'activité mesurée dans le pic majeur est approximativement cinq fois supérieure au contrôle. ET-1 stimule l'activité de ERK, celle-ci est révélée dans un pic majeur de phosphorylation de MBP élué à une concentration de NaCl de 200 mM (fraction 27 fig 1a). L'activité de ERK stimulée par NE est plus faible, la phosphorylation de MBP est observée dans des pics mineurs élués à des concentrations de NaCl respectives de 200 mM, 230 mM et 300 mM (fractions 27, 29 et 37 fig 1a). Nous avons comparé les effets des deux agonistes hypertrophiques physiologiques sur l'activité de ERK, la moyenne obtenue dans nos deux séries d'expériences montre une augmentation de l'activité de ERK respectivement de 30% et 125% par NE et ET-1. Il est important de souligner que l'activité kinase de MBP ne correspond pas uniquement à l'activation des voies ERK1/2. MBP pouvant être phosphorylée par d'autres kinases, la présence d'un ou plusieurs pics peut résulter de l'activation de différentes kinases ou de la même kinase éluée à différentes concentrations de NaCl. On observe un pic d'activité kinase dans la fraction 5 (figure 1). Toutefois les 8 premières fractions correspondent aux protéines qui ne sont pas retenues par la colonne Mono Q (protéines de charge neutre ou de même charge que la Mono Q) et aux protéines présentes dans le lavage de la Mono Q. Cette activité ne peut donc être prise en compte dans l'analyse de nos résultats.

Les fractions séparées par FPLC après les traitements par NE, ET-1 ou PdBu ont également été analysées par les tests de l'activité MAPK ERK1/2 par filtre. Cette méthode permet de vérifier que la phosphorylation de MBP traduit l'activité de ERK1/2. Il a été démontré dans des expériences similaires que l'activité kinase de MBP détectée par les filtres correspond à l'activité de ERK 1 et ERK 2 (165,166). Les résultats obtenus par les deux méthodes montrent le même modèle de stimulation. L'activité de ERK1/2 est puissamment stimulée par PdBu, un pic majeur a été élué à une concentration de NaCl de 200 mM (fraction 26, fig 1b). Un pic de phosphorylation de MBP a été élué après stimulation par ET-1 à une concentration de NaCl de 200 mM (fraction 26, fig 1b). La stimulation par NE de l'activité de MBP a été détectée dans un pic élué à une concentration de NaCl de 300 mM (fraction 38 fig 1b). Pour résumer, l'activité de ERK dans les myocytes cardiaques des rats néonataux est stimulée par les trois agonistes hypertrophiques. Il apparaît toutefois, que la stimulation par PdBu est très puissante comparée aux deux autres agonistes.

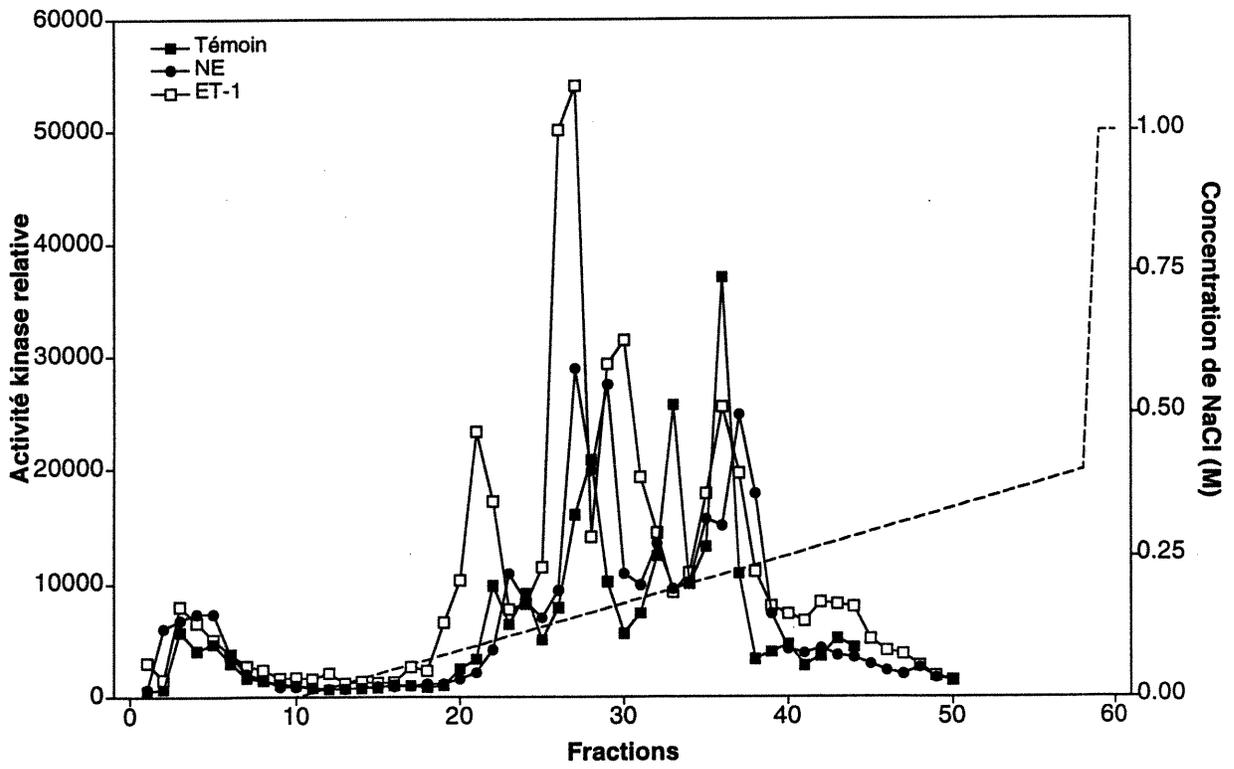
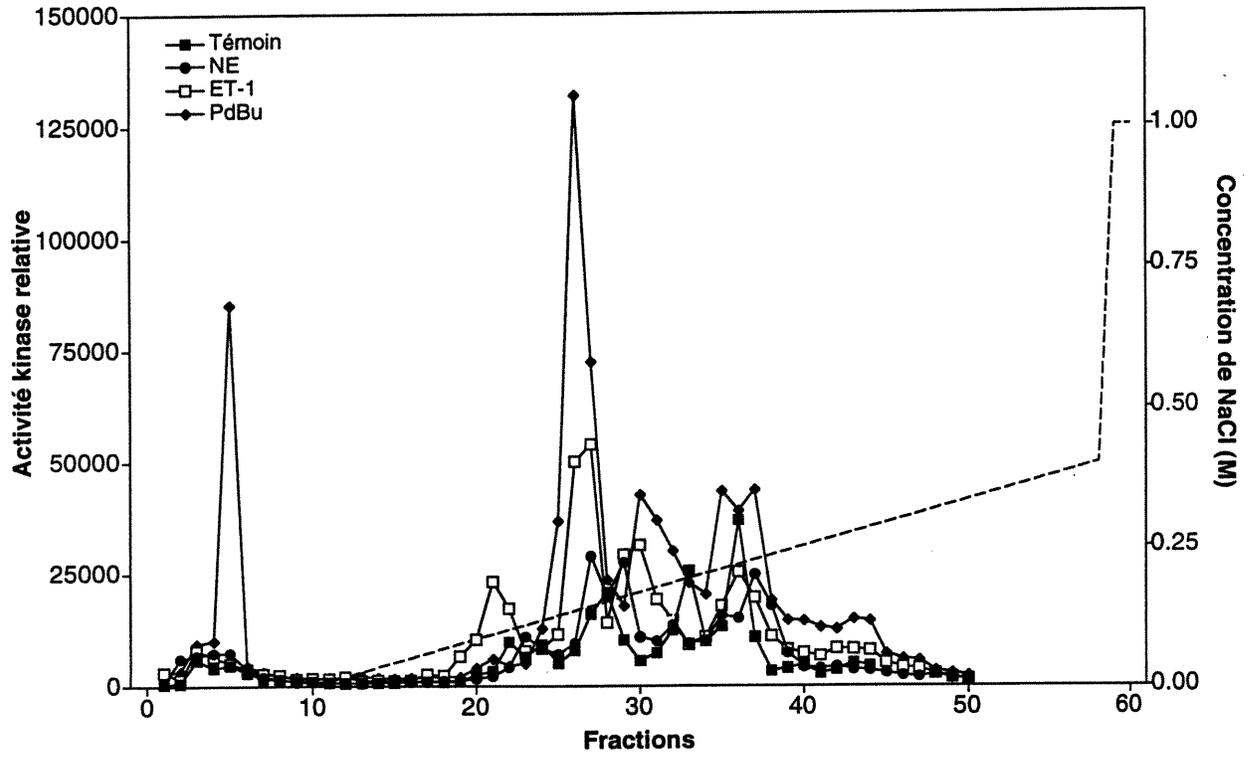


Figure 1.a

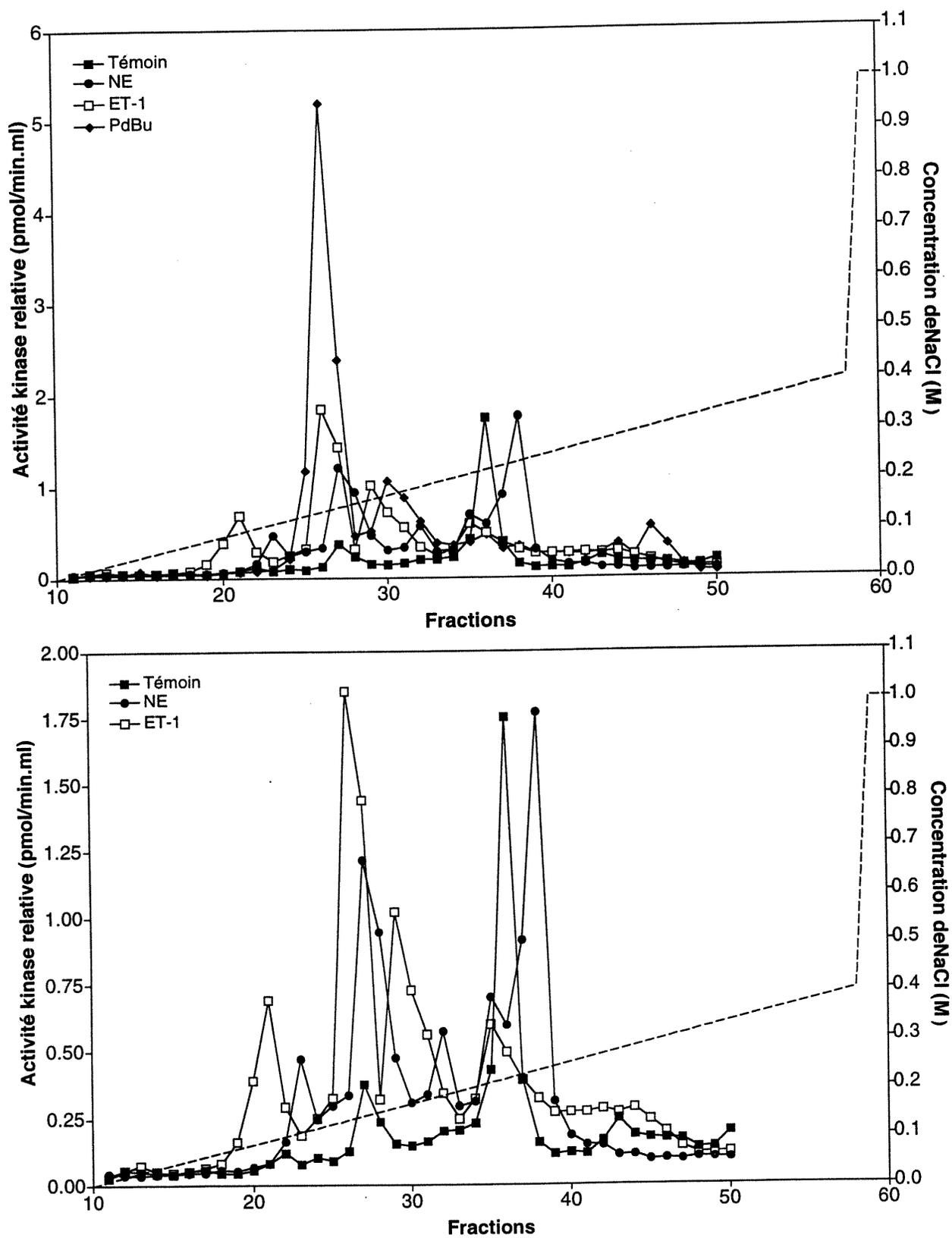


Figure 1.b

**Figure 1a : Activité de MAPK ERK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés, stimulés par ET-1, NE et PdBu**

Les cardiomyocytes ont été stimulés pendant 5 min par 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 ou 100 nM PdBu. Les lysats protéiques obtenus ont été séparés par FPLC sur une colonne Mono Q saturée avec un gradient linéaire de NaCl (0-0,4 M, ligne en pointillée). Les fractions obtenues ont été testées pour la mesure de la phosphorylation de MBP, substrat de ERK comme décrit dans les méthodes. L'incorporation de la radioactivité a été mesurée par phosphor-imaging (Bio-Rad GS 525 molecular analyser). Les valeurs ont été normalisées par rapport au niveau le plus élevé d'activité mesurée. La figure du bas a permis de comparer les effets de la stimulation par NE et ET-1 sur l'activité de ERK.

**Figure 1b : Activation de la voie ERK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés exposés à NE, ET-1 et PdBu**

L'activité de ERK a été testée par la méthode des filtres comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les fractions 11 à 50 qui ont été séparées par FPLC sur la colonne Mono Q ont été analysées en présence du substrat MBP. L'incorporation de la radioactivité a été mesurée dans un compteur  $\beta$  (Beckman). L'activité kinase a été exprimée en pmoles de phosphate incorporé dans le substrat par min et par ml de lysat protéique. Les valeurs ont été normalisées par rapport au niveau de stimulation le plus élevé. La figure du bas a permis de comparer les effets de la stimulation par NE et ET-1 sur l'activité de ERK.

### **3.1.2 Activation de la voie JNK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés traités par ET-1, NE et PdBu**

L'activation de la voie JNK a déjà été observée dans les myocytes cardiaques traités par ET-1 et PE (89,90). Pour évaluer l'activation de JNK dans les myocytes cardiaques, nous avons stimulé durant 5 min les cellules par 100 nM PdBu, 10 nM ET-1 ou 1  $\mu$ M NE. 500  $\mu$ g de lysats protéiques ont été séparés par FPLC sur la colonne Mono Q. Les fractions obtenues ont été testées en présence du substrat spécifique de JNK, c-jun. L'activité kinase de JNK stimulée par PdBu est très forte, quatre fois la valeur contrôle, elle est révélée dans un pic élué à une concentration de NaCl de 200 mM (fraction 26, fig 2). NE et ET-1 stimulent aussi JNK dans les mêmes fractions. La phosphorylation de c-jun stimulée par ET-1 est détectée dans un pic élué à une concentration de NaCl de 200 mM (fraction 26, fig 2). La stimulation par NE de l'activité de JNK a été observée dans un pic de phosphorylation de c-jun élué à une concentration de NaCl de 216 mM (fraction 27, fig 2). En comparant les effets de NE et ET-1 sur l'activité de JNK, on obtient une augmentation par rapport à l'activité des cellules quiescentes de respectivement 91% et 190% (n=2). Comme pour la voie ERK, JNK est activé par les trois facteurs hypertrophiants, toute fois la stimulation par PdBu est la plus puissante.

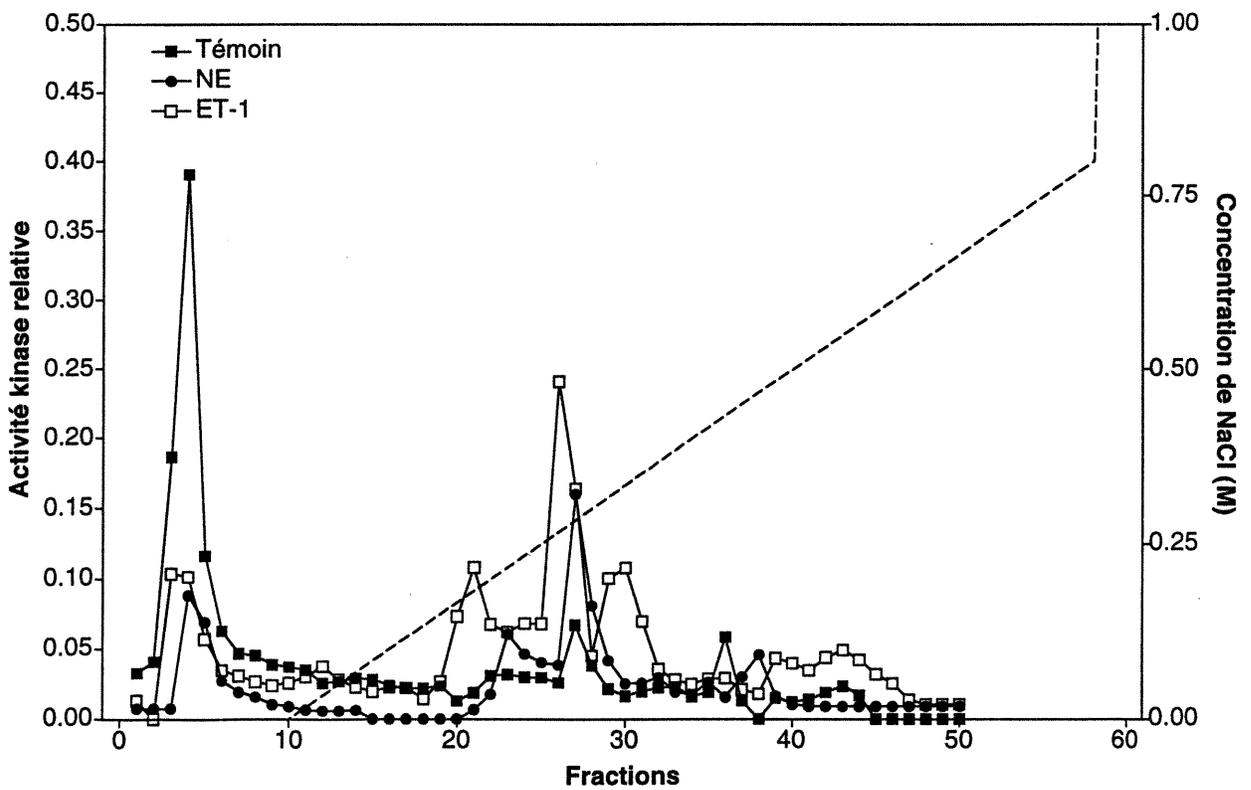
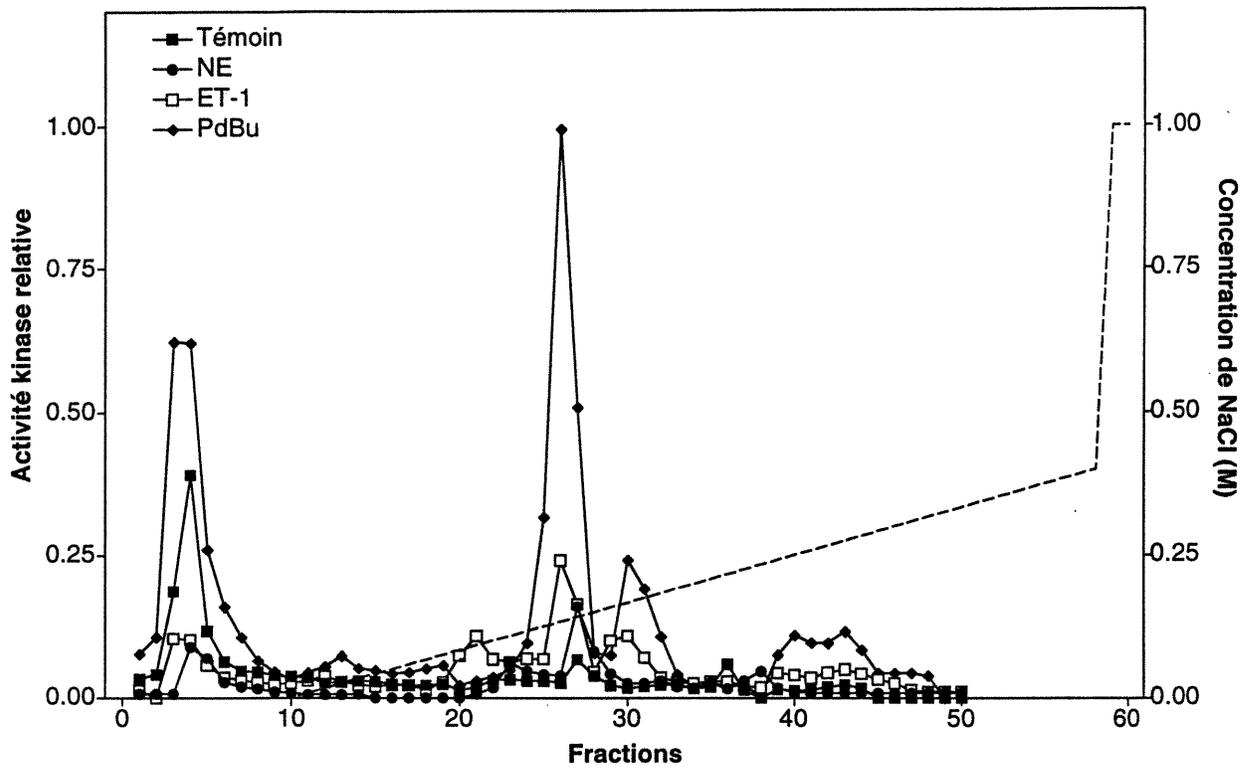


Figure 2

**Figure 2 : Activation de la voie JNK dans les myocytes cardiaques des ventricules des rats nouveau-nés stimulés par ET-1, NE et PdBu**

Les cardiomyocytes des rats nouveau-nés ont été exposés 5 min à 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 ou et 100 nM PdBu. Les lysats protéiques ont été séparés par FPLC sur une colonne Mono Q saturée par un gradient linéaire de NaCl (0-0,4 M, ligne en pointillée). Les fractions obtenues ont été testées pour la mesure de la phosphorylation de c-jun, substrat de JNK comme décrit dans la section matériel et méthodes. L'incorporation de la radioactivité a été mesurée par phosphor-imaging (Bio-Rad GS 525 Molecular analyser). Les valeurs ont été normalisées par rapport au niveau d'activité le plus élevé. La figure du bas a permis de comparer les effets de la stimulation par NE et ET-1 sur l'activité de JNK.

### 3.1.3 Activation de p38 MAPK par ET-1, PdBu et NE

L'activation de la voie p38 MAPK a été démontrée dans les myocytes cardiaques stimulés par PE (96) et par ET-1 (97). Pour explorer l'activité de la voie p38 MAPK nous avons examiné la stimulation de l'activité de son substrat MAPKAPK-2. Une fois activée, MAPKAPK-2 phosphoryle une petite protéine de choc thermique hsp 27 (189). Il est important de souligner que Hsp 27 n'est pas un substrat spécifique de MAPKAPK-2, elle peut être phosphorylée par d'autres kinases. Nous avons mesuré l'activité de MAPKAPK-2 dans les myocytes des rats nouveau-nés traités par 1  $\mu$ M NE, 10 nM ET-1 et 100 nM PdBu. Les cellules ont été exposées pendant 5 min aux différents agonistes puis 500  $\mu$ g de lysats protéiques ont été séparés par FPLC sur colonne Mono Q et Mono S. L'activité de MAPKAPK-2 a été dans un premier temps analysée dans les fractions séparées par la colonne Mono Q. Les résultats obtenus ont révélé six pics de phosphorylations de hsp 27 (fractions 26, 35, 37, 40, 43 et 47 fig 3a). L'activité induite par PdBu révèle un pic majeur élué à une concentration de NaCl de 350 mM (fraction 43 figure 3a). L'activité détectée dans le pic majeur est cinq fois plus élevée que celle dans les cellules quiescentes. Deux pics d'activité ont été détectés dans les fractions 37 et 40, élués à des concentrations de NaCl respectives de 300 mM et 320 mM (fig 3a). Trois autres pics mineurs observés dans les fractions 26, 35 et 47 ont été élués à des concentrations de NaCl respectives de 200 mM, 280 mM et 400 mM (fig 3a). L'activité de hsp 27 n'étant pas spécifique de MAPKAPK-2, un ou plusieurs pics d'activité peuvent résulter de l'activité d'autres kinases présentes dans les fractions protéiques. Néanmoins, on peut considérer que la stimulation par PdBu induit une très forte activité de MAPKAPK-2. NE stimule la phosphorylation de hsp 27 : un pic majeur a été détecté dans la fraction 38, élué à une concentration de NaCl de 300 mM (fig 3a). Cependant l'activité de ce pic est plus faible que celle

observée dans le pic stimulé par PdBu. Un second pic plus faible a été détecté dans la fraction 35, élué à une concentration de NaCl de 280 mM (fig 3a). Contrairement à ce qui a été observé pour ERK et JNK, ET-1 active faiblement hsp 27. En effet un seul pic d'activité est révélé, élué à une concentration de NaCl de 350 mM (fraction 43 figure 3a). En comparant les effets de NE et ET-1 sur l'activité kinase de p38, nous avons obtenu une augmentation de la phosphorylation de hsp 27 de 55% et 77% (n=2). Comme pour ERK et JNK, on constate que les trois agonistes stimulent l'activité de p38 MAPK, et que PdBu active puissamment cette voie.

Les huit premières fractions séparées par FPLC sur la colonne Mono Q ont été séparées sur la colonne Mono S. L'activité de MAPKAPK-2 a été analysée par des tests de stimulation de l'activité MAPK en présence du substrat hsp 27. Pour pouvoir comparer les effets de l'activation de MAPKAPK-2 dans les fractions séparées par la colonne Mono Q et celles séparées par la colonne Mono S, les valeurs ont été normalisées au niveau le plus élevé d'activité observé dans la Mono Q. L'activité de hsp 27 stimulée par PdBu a été révélée dans un pic majeur élué à une concentration de NaCl approximative de 320 mM (fraction 40, fig 3b). NE et ET-1 ne semblent pas stimuler l'activité de MAPKAPK-2 dans les fractions séparées dans la MONOS. Ces résultats suggèrent la présence de deux isoformes de MAPKAPK-2, dont une serait activée dans les fractions séparées par la colonne Mono Q et l'autre dans la colonne Mono S. Stokoe et ses collaborateurs ont identifié deux isoformes de MAPKAPK-2 dans les cellules du muscle lisse de lapin (190). Une étude récente de Allen et ses collaborateurs (201) a montré la présence de deux formes distinctes de MAPKAPK-2 qui ont été dénommées MAPKAPK-2 $\alpha$  et MAPKAPK-2 $\beta$  dans les myocytes cardiaques de rats adultes. L'activité de chacune de ces deux isoformes a été séparée par chromatographie sur des colonnes Mono Q et Mono S.

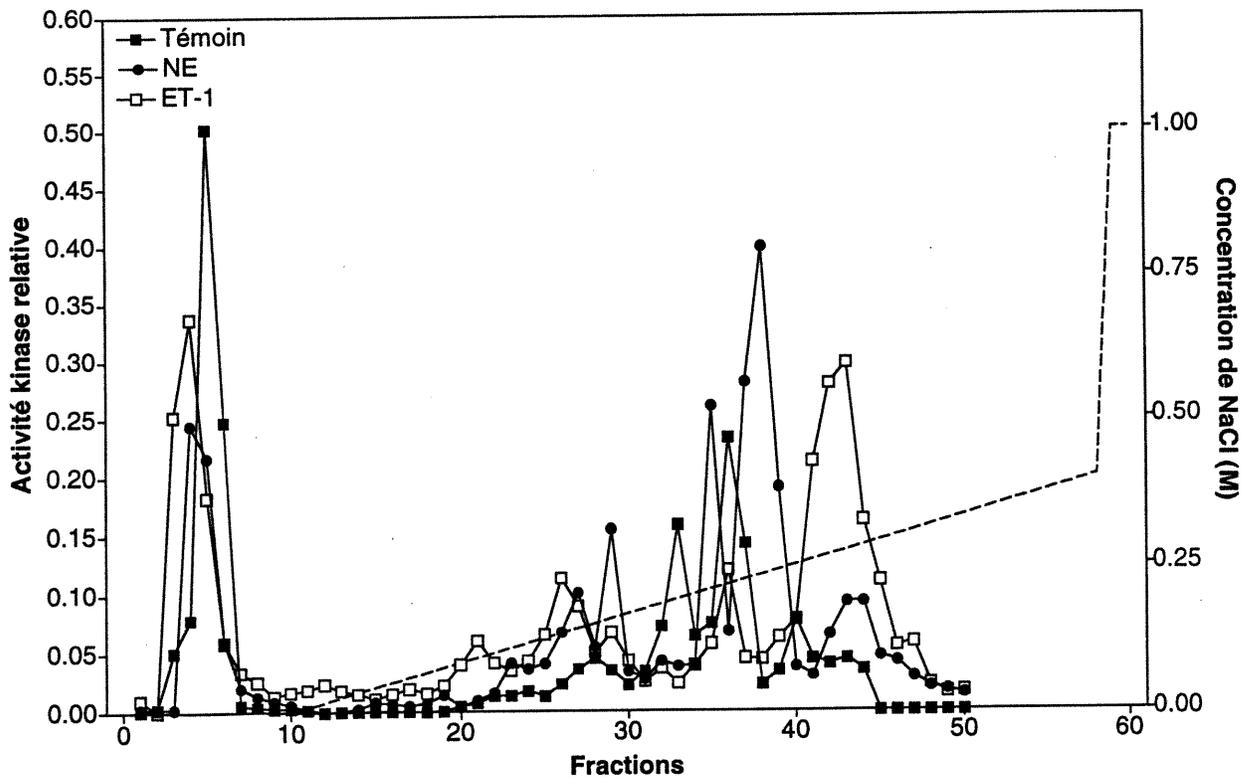
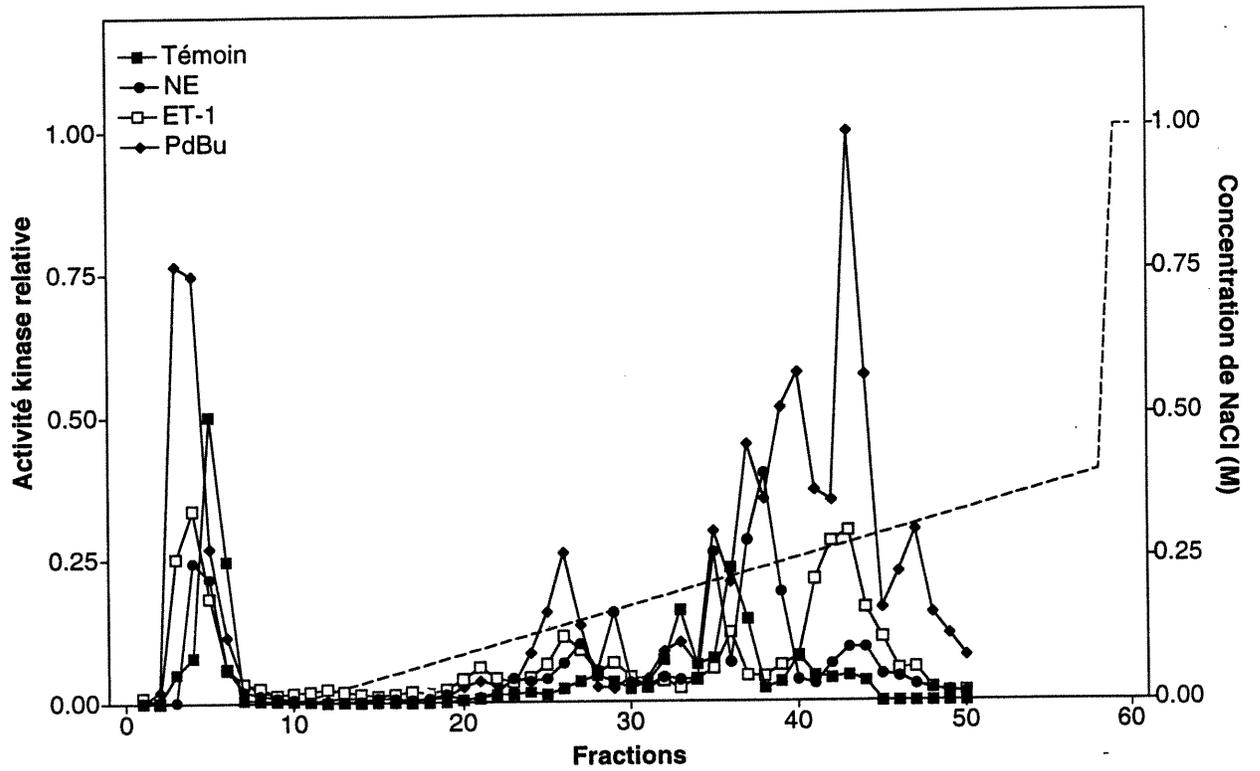


Figure 3.a

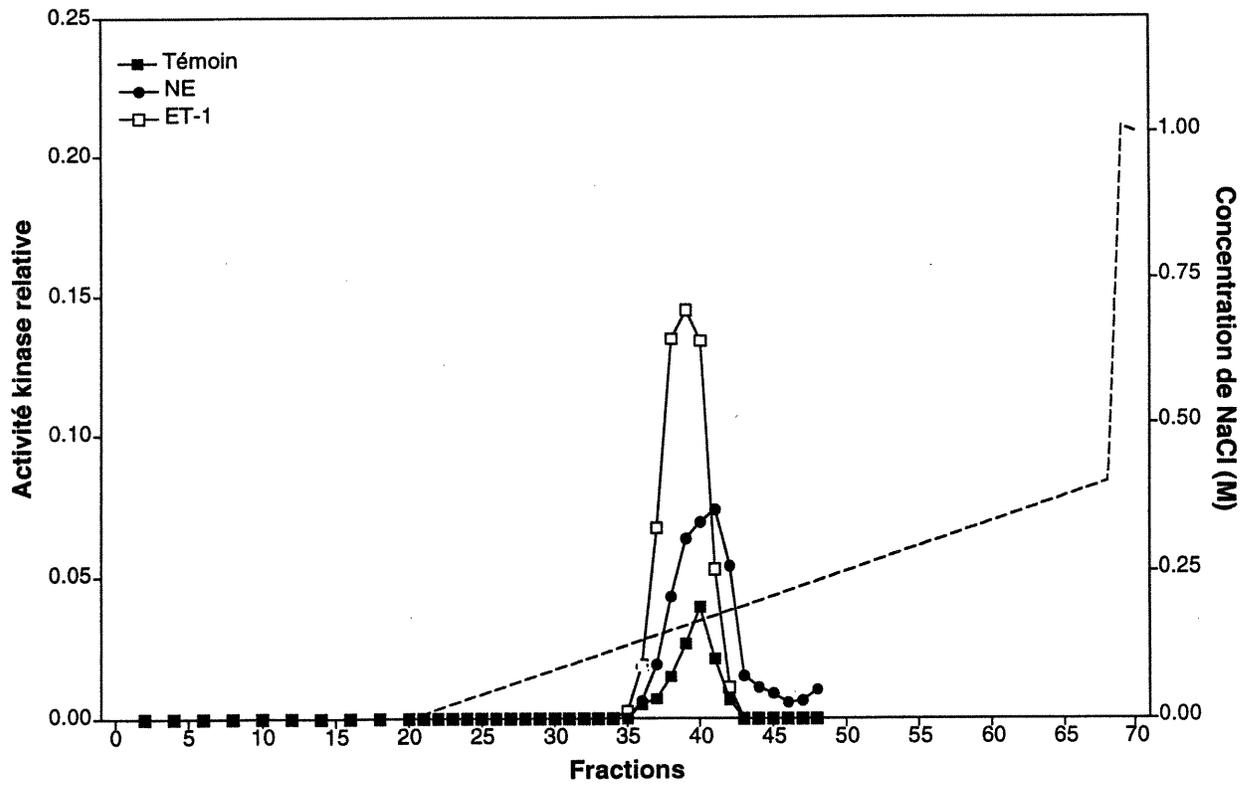
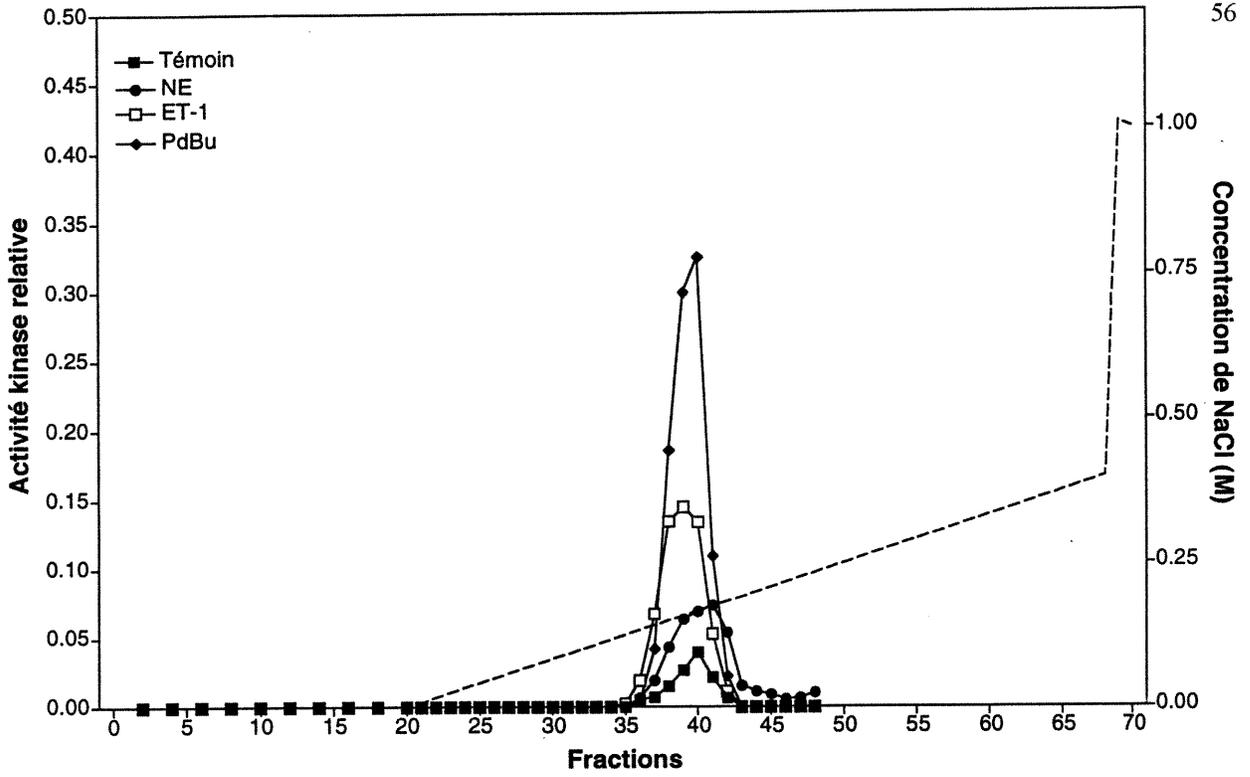


Figure 3.b

**Figure 3a : Activation de p38 MAPK dans les myocytes cardiaques des ventricules des rats nouveau-nés stimulés par ET-1, NE et PdBu**

L'activation de p38 MAPK a été testée de façon indirecte par la mesure de l'activité d'une kinase en aval MAPKAPK-2 en utilisant hsp 27 recombinant comme substrat. Les myocytes cardiaques isolés des ventricules des rats nouveau-nés ont été maintenus en culture 24 h dans du sérum et 48 h dans un milieu DMEM sans sérum. Les cellules ont été traitées par 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 ou 100 nM PdBu, puis lysées comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les lysats protéiques (500  $\mu$ g) ont été séparés par FPLC sur une colonne Mono Q. La phosphorylation de hsp 27 a été détectée dans un profil d'élution par un gradient linéaire de NaCl (0-0.4 M). L'incorporation de la radioactivité a été mesurée par phosphor-imaging (Bio-Rad GS525 Molecular analyser). Les valeurs ont été normalisées au niveau le plus haut d'activité mesurée. La figure du bas a permis de comparer les effets de la stimulation par NE et ET-1 sur l'activité de MAPKAPK-2.

**Figure 3b : Activation de MAPKAPK2 dans les myocytes des ventricules des rats nouveau-nés stimulés par ET-1, NE et PdBu et séparée par FPLC sur colonne MONOS**

Les huit premières fractions obtenues dans la colonne Mono Q (figure 4a) ont été combinées puis séparées une seconde fois par FPLC sur une colonne Mono S, saturée par un gradient de NaCl (0-0,4 M, ligne en pointillée). L'activité de MAPKAPK-2 a été mesurée dans les fractions obtenues dans la colonne Mono S, en présence du substrat hsp 27. L'incorporation de la radioactivité a été mesurée par phosphor-imaging (Bio-Rad GS 525 Molecular analyser). Les valeurs ont été normalisées au niveau le plus élevé d'activité mesurée. La figure du bas, montre les effets de la stimulation de l'activité de MAPKAPK-2, par NE et ET-1.

### **3.1.4 L'activation des voies MAPK ERK ne semble pas être suffisante pour stimuler l'hypertrophie cardiaque observée in vitro dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés.**

Pour explorer le rôle de la voie ERK dans la réponse hypertrophique stimulée par NE et ET-1, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie. PD 98059 inhibe MEK 1 en se liant à sa forme inactive empêchant son activation par Raf et les MKK (191). PD 98059 n'affecte pas de façon significative l'activité de MEK et de ERK lorsqu'elles sont déjà phosphorylées. C'est un inhibiteur sélectif de la voie MAPK ERK et il ne semble pas agir sur les voies JNK et p38 MAPK (28). La stimulation des myocytes cardiaques pendant 24h par 1  $\mu$ M NE et 10 nM ET-1 augmente l'incorporation de la [<sup>3</sup>H] leucine de respectivement 52 $\pm$ 7% et de 33 $\pm$ 2% (figure 4). Le prétraitement de 15 min par 50  $\mu$ M PD 98059 n'inhibe pas la synthèse protéique induite par NE (42 $\pm$ 2%) et par ET-1(32 $\pm$ 4%). Ces résultats montrent que la voie ERK activée dans les myocytes cardiaques par ET-1 et NE n'affecte pas la croissance cellulaire.

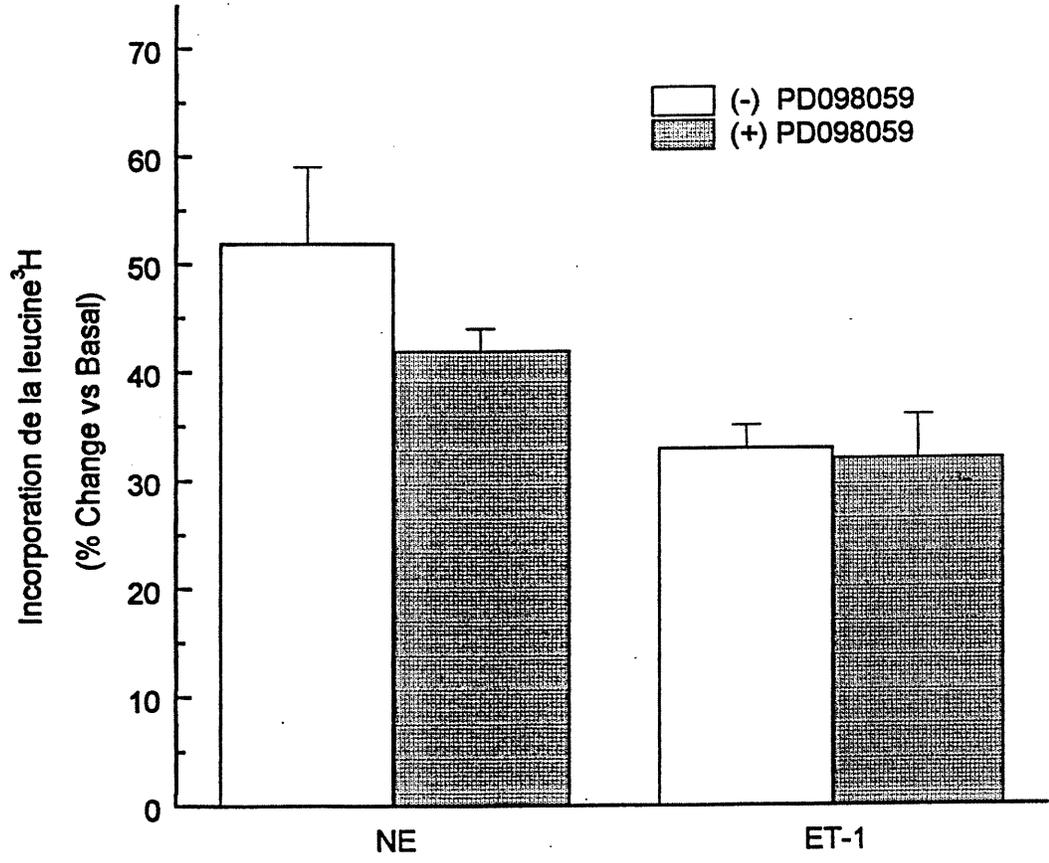


Figure 4

**Figure 4 : PD 98059 n'inhibe pas la synthèse protéique induite par NE et ET-1 dans les myocytes cardiaques des ventricules des rats nouveau-nés**

Les myocytes isolés à partir des ventricules des rats nouveau-nés cultivés dans un milieu sans sérum pendant 48 h ont été prétraités 15 min avec 50  $\mu$ M PD 98059 l'inhibiteur de MEK, puis stimulés pendant 24h par 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 en présence de 2  $\mu$ Ci/ml de la [ $^3$ H] leucine comme décrit dans la section matériel et méthodes. La synthèse protéique a été mesurée par l'incorporation de la  $^3$ H leucine. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  l'erreur type (S.E.M). Des résultats similaires ont été obtenus dans quatre différentes expériences. Les résultats sont représentés comme pourcentage du taux basal de la synthèse protéique.

### **3.1.5 L'activation de p38 MAPK stimulée par NE, ET-1 et PdBu n'a pas d'effet sur la synthèse protéique des myocytes cardiaques des rats nouveau-nés.**

Pour explorer le rôle de la voie p38 MAPK dans l'hypertrophie des myocytes cardiaques en culture, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie. SB-203580 est un composé de la classe des pyridinyl imidazoles qui inhibe les isoformes P38  $\alpha/\beta$  MAPK (75). Les cellules prétraitées 15 min par SB-203580 ont été exposées pendant 24 h à 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 ou 100 nM PdBu en présence de la [<sup>3</sup>H] leucine. Les résultats obtenus montrent que les stimulations par ET-1 NE et PdBu augmentent la synthèse protéique par 45% $\pm$ 3, 60% $\pm$ 2 et 45% $\pm$ 4 respectivement. La présence de SB-203580 n'affecte pas la synthèse protéique (figure 5).

### **3.1.6 L'activité de p38 stimulée par NE est inhibée par SB-203580**

Pour vérifier l'effet de SB-203580 sur la voie p38 MAPK, nous avons stimulé l'activation de cette voie dans les myocytes cardiaques. Les cellules ont été traitées pendant 5 min par 1  $\mu$ M NE. La NE a stimulé de 240% l'activité de MAPKAPK-2 (figure 6). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les fractions séparées par la colonne Mono Q. Le prétraitement par 10  $\mu$ M SB-203580 inhibe complètement la réponse stimulée par NE (figure 6). Ces résultats démontrent que la voie p38 MAPK, sensible à SB-203580, activée dans les cardiomyocytes ne semble pas participer au processus hypertrophique de ces cellules.

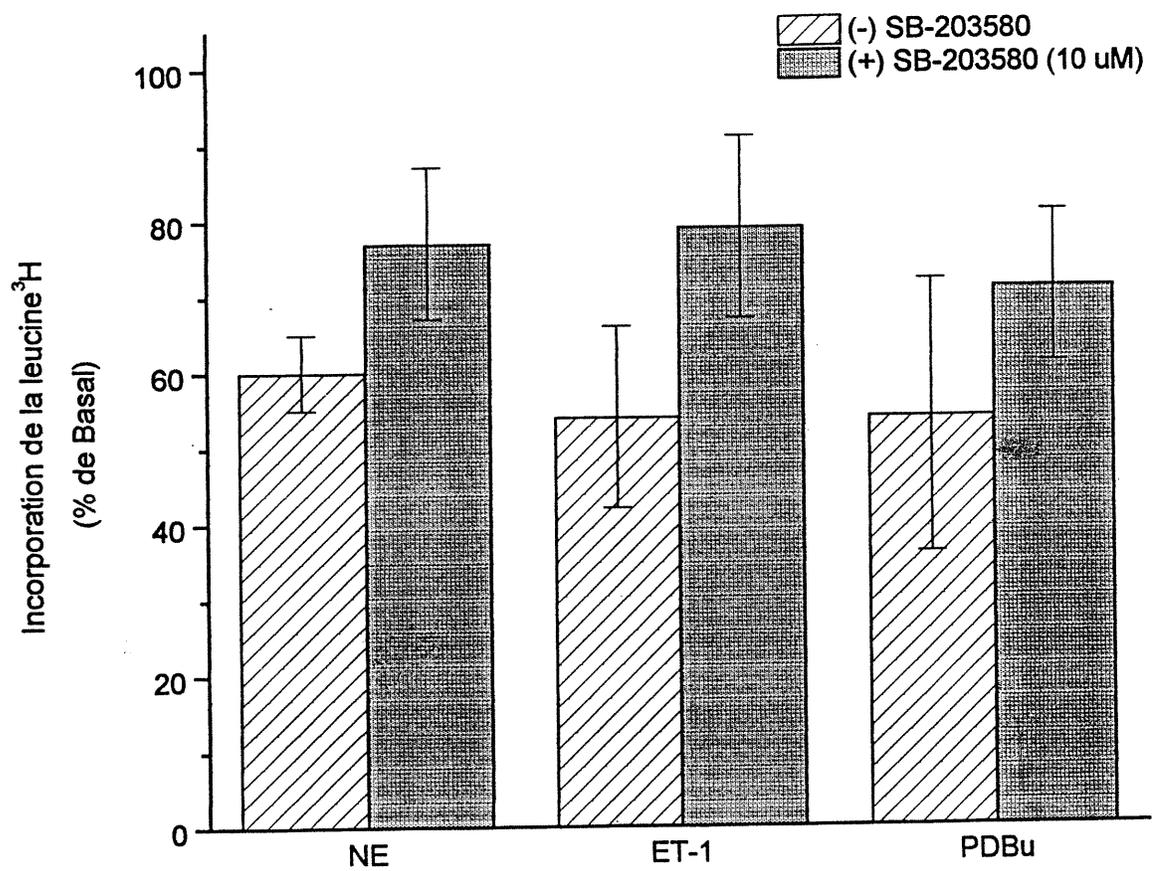


Figure 5

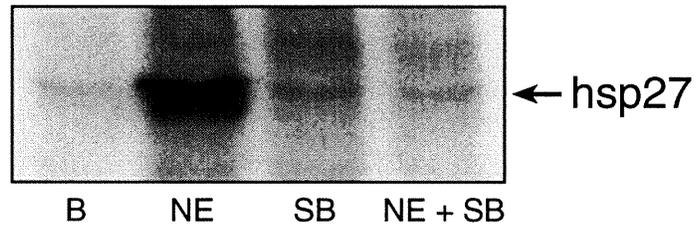


Figure 6

**Figure 5 : SB-203580 n'a pas d'effet sur la synthèse protéique induite par NE, ET-1 et PdBu dans les myocytes cardiaques.**

Les cellules ont été traitées 15 min par 10  $\mu$ M SB-203580 avant d'être exposées pendant 24 h à 1  $\mu$ M NE ou 10 nM ET-1 ou 100 nM PdBu. La synthèse protéique a été mesurée par l'incorporation de la [ $^3$ H] leucine. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  S.E.M. Les résultats sont représentés comme un pourcentage du taux basal de la synthèse protéique.

**Figure 6 : Effet de NE et de SB-203580 sur l'activité de p38 MAPK dans les myocytes cardiaques.**

Les myocytes des ventricules des rats nouveau-nés maintenus en culture dans un milieu sans sérum pendant 48 h ont été traités 15 min par 10  $\mu$ M SB-203580 avant d'être stimulés 5 min par 1  $\mu$ M NE. Les lysats protéiques préparés ont été immunoprécipités avec un complexe AC MAPKAPK2-protéine A/G Agarose comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les complexes immuns ont été lavés et l'activité de p38 MAPK a été testée par la mesure de l'activité de MAPKAPK-2 en présence du substrat hsp 27. L'incorporation de la radioactivité a été quantifiée par phosphor-imaging (Bio-rad GS 525 Molecular analyser). Les résultats ont été scannés par Laser densitométrie. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux différentes expériences.

### **3.2 Rôle de NO dans la régulation de la régulation de l'activité de MAPK ERK : Modulation de l'expression de MKP-1**

#### **3.2.1 NO stimule l'expression de l'ARNm MKP-1 dans les fibroblastes cardiaques des rats nouveau-nés.**

L'action antiproliférative du GMPc intracellulaire a été démontrée dans les fibroblastes cardiaques ainsi que dans les cardiomyocytes stimulés par NE (184). La production de GMPc intracellulaire est stimulée par le NO ainsi que par l'ANF (184). Pour explorer le rôle du NO dans la régulation de l'activité de ERK1/2, nous avons examiné l'expression de MKP-1 dans les fibroblastes cardiaques des rats nouveau-nés. Le traitement des fibroblastes avec 100  $\mu$ M SNAP a augmenté l'expression de l'ARNm MKP-1 après 15 min de 220 $\pm$ 30%. L'expression de MKP-1 est maximale à 30 min (350 $\pm$ 60%), elle a été maintenue entre 60 et 120 min (figure 7). Ces résultats démontrent que le NO module l'induction de l'expression de MKP-1 et, que cet effet est probablement médié par le second messenger GMPc. Pour vérifier cette hypothèse, les fibroblastes cardiaques ont été traités avec le 8-bromo GMPc pendant 30 min. Les résultats ont montré une augmentation de l'expression de MKP-1 équivalente à 3 fois le témoin (n=2) (les résultats ne sont pas montrés). Une étude similaire réalisée dans les cardiomyocytes, montre le même profil d'expression de l'ARNm MKP-1 (n=1) (figure 8). De plus dans les cardiomyocytes on voit une seconde bande d'expression de MKP-1, plus petite qui pourrait correspondre à une autre isoforme de MKP-1 (figure 8)

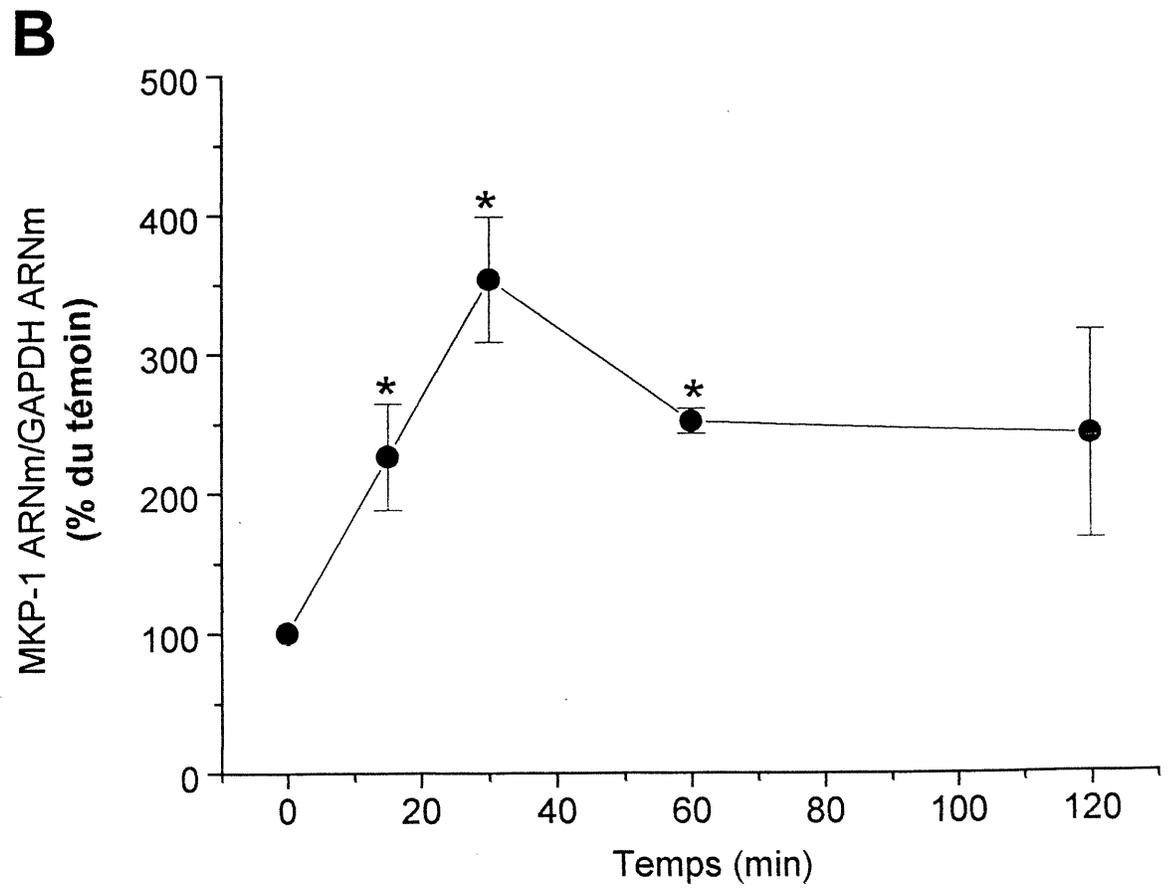
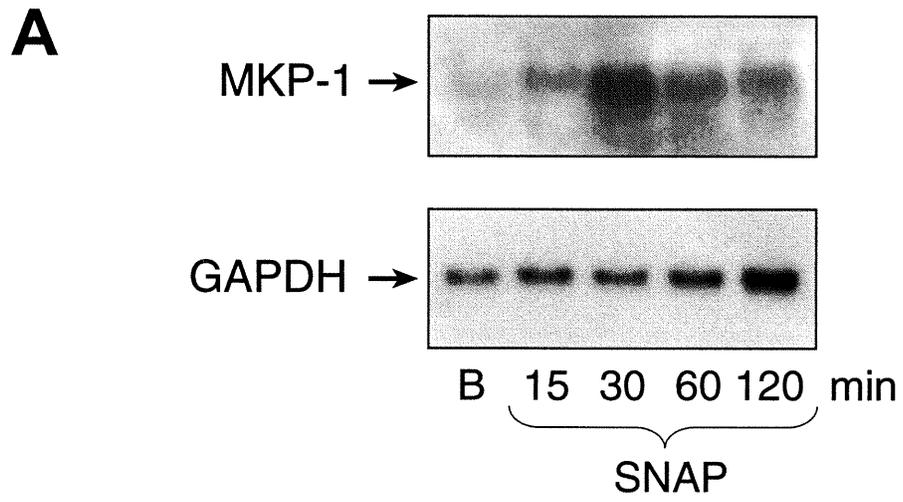


Figure 7

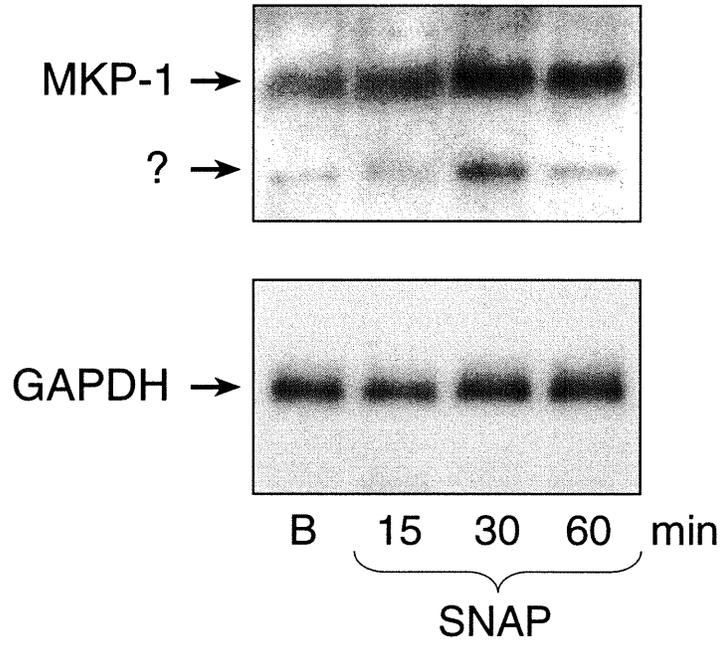


Figure 8

**Figure 7 : SNAP stimule l'expression de MKP-1 dans les fibroblastes cardiaques**

Les fibroblastes cardiaques des rats nouveau-nés ont été traités par 100  $\mu$ M SNAP pour différents temps de stimulation 15, 30, 60, et 120 min. Les ARN totaux (15  $\mu$ g) ont été séparés sur un gel de 1,3% agarose, 4% formaldéhyde, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. **(A)** La membrane a été hybridée par une sonde radiomarquée pour le gène codant pour MKP-1, et par une sonde codant pour le gène GAPDH, afin de normaliser les quantités d'ARN sur la membrane. Après chaque hybridation, la membrane était soumise à l'autoradiographie et le film ainsi obtenu était analysé par densitométrie au laser. **(B)** Le niveau de l'ARNm de MKP-1 a été quantifié par densitométrie au laser. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  S.E de quatre expériences. SNAP 15 min  $p < 0,03$ , SNAP 30 min  $p < 0,02$ , SNAP 60 min  $p < 0,01$  comparativement au contrôle.

**Figure 8 : SNAP induit l'expression de l'ARNm de MKP-1 dans les myocytes cardiaques**

Les myocytes isolés des ventricules des rats nouveau-nés ont été traités par 100  $\mu$ M SNAP pour différents temps de stimulation 15, 30 ou 60 min. Les ARN totaux (15  $\mu$ g) ont été séparés sur un gel de 1,3 % d'agarose et 4% de formaldéhyde puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été hybridée par une sonde radiomarquée codant pour le gène MKP-1. Les résultats ont été normalisés en hybridant la membrane par une sonde radiomarquée codant pour le gène GAPDH. Puis la membrane a été exposée à l'autoradiographie.

## CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION

## 4.1 Discussion

### 4.1.1 Rôles des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque

Le rôle des voies MAPK dans l'hypertrophie cardiaque a reçu beaucoup d'attention durant cette dernière décennie. L'élucidation des mécanismes moléculaires qui mènent à la genèse du phénotype hypertrophique présente un intérêt clinique considérable, et a suscité de nombreuses recherches.

Plusieurs stimuli ont été impliqués dans l'hypertrophie des cardiomyocytes, parmi eux on reconnaît les facteurs de croissance (FGF et PDGF), les cytokines et les facteurs neurohormonaux (les agonistes  $\alpha_1$ -AR, ET-1, A II). L'équipe de Chien a démontré que la stimulation des myocytes cardiaques des rats néonataux par ET-1 et PMA induit des réponses caractéristiques de l'hypertrophie (augmentation du contenu protéique, accumulation et réorganisation des sarcomères, réexpression de gènes foetaux et des gènes codant pour des protéines contractiles) (114). La PKC a été considérée comme étant le principal effecteur des réponses hypertrophiques (114). Dans notre étude nous avons démontré que les GPCR (Gq/Gi) tels que NE et ET-1 ainsi que PdBu augmentent la synthèse protéique des myocytes cardiaques des rats nouveau-nés (Fig 4 et 5). Nous nous sommes également intéressés aux effets régulateurs des voies MAPK sur la croissance des myocytes cardiaques induite par ces facteurs.

L'activation de la voie MAPK ERK a été obtenue après 5 min de stimulation par ET-1, NE et PdBu. Nous avons observé une puissante stimulation de cette activité par PdBu (fig1a et1b). L'activation de la voie ERK par ET-1 est plus forte que celle stimulée par NE (fig1a). Toutefois, on ne remarque pas d'écart important quant à la

stimulation de la synthèse protéique par NE et ET-1 (fig 4). Pour examiner les effets de l'inhibition de la voie ERK 1/2 sur la synthèse protéique des cardiomyocytes, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie, PD 98059, dont le principal effet est d'inhiber l'activation de MEK1 par Raf (191). Nos résultats démontrent que PD 98059 n'a aucun effet sur la synthèse protéique des myocytes cardiaques induite par NE et ET-1. Une étude récente de Choukroun et collaborateurs a montré que le traitement des myocytes avec 50  $\mu$ M PD 98059 bloque l'activité de ERK stimulée par ET-1, mais ne bloque pas la synthèse protéique (171).

Plusieurs études ont identifié l'activation de Ras comme événement proximal majeur impliqué dans l'hypertrophie des myocytes cardiaques. In vitro, l'injection d'une forme oncogénique de Ras dans les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés augmente la taille de la cellule et induit l'activation d'un promoteur de l'ANF (192,193). Une étude menée dans notre laboratoire (202) démontre également l'implication de Ras dans l'hypertrophie cardiaque. En effet la stimulation des cardiomyocytes des ventricules des rats nouveau-nés par 1  $\mu$ M NE et 10 nM ET-1 pendant 24h, augmente la synthèse protéique et induit l'expression de l'ARNm du gène codant pour l'ANF qui est un marqueur de l'hypertrophie cardiaque. Le traitement des mêmes cellules par BMS-191563, un inhibiteur de Ras, bloque la synthèse protéique et inhibe l'expression de l'ANF. Cependant le prétraitement par BMS-191563 inhibe complètement l'activation de ERK stimulée par NE, et partiellement celle induite par ET-1. Ces résultats démontrent l'activation par Ras de la voie MAPK ERK, mais l'effet de Ras sur l'hypertrophie des myocytes cardiaques n'est pas transmis par la voie ERK1/2. L'absence d'inhibition complète par BMS-191563 de la voie ERK stimulée par ET-1 suggère l'implication d'une voie de signalisation autre que Ras. Bogoyevitch et ses collaborateurs ont suggéré que l'activation de ERK par ET-1

dépendait de deux voies de signalisation dont l'une implique la PKC (166). Les mécanismes de transmission des signaux de la surface de la cellule au noyau ne sont pas complètement élucidés, mais il demeure néanmoins clair que l'activation de la PKC est un événement proximal qui peut initier la réponse hypertrophique(164). Les éléments en faveur du rôle de la PKC sont d'une part l'induction par les esters de phorbol de certains traits caractéristiques de la réponse hypertrophique (164,163) et d'autre part, les agonistes hypertrophiques (ET-1 et NE) qui agissent à la surface de la cellule par des GPCR (Gq/Gi) activant la PLC $\beta$ . Celle-ci stimule l'hydrolyse des phosphoinositides libérant ainsi le DAG et l'IP3 qui activent la PKC (157,124,121). Nos résultats sont de ce fait en accord avec des études précédentes qui ont démontré par l'utilisation de PD 98095 inhibiteur de MEK1, de mutant constitutivement actif de MEK1 ou de mutant dominant inhibiteur de Raf 1 et de ERK, que cette voie n'était ni nécessaire ni suffisante pour l'expression des traits caractéristiques de la réponse hypertrophique (194,169, 90,195).

Les voies MAPK JNK et p38 sont connues pour être activées dans divers types cellulaires essentiellement par les facteurs de stress cellulaire tels que les cytokines (IL-1 $\beta$ ), les irradiations (UV) et le choc hyperosmotique. Des études récentes ont démontré l'activation de JNK/SAPK par les agonistes hypertrophiques (89, 90). Nous avons obtenu l'activation de JNK après 5 min d'exposition des myocytes des ventricules de rats nouveau-nés aux irradiations UV, et cette activation est maximale après 20 minutes. La voie JNK a également été activée par IL1- $\beta$  après 5 min de stimulation et cette activation a été maintenue pendant 30 min (les résultats ne sont pas montrés). Nous avons démontré l'activation de la voie JNK dans les myocytes cardiaques des ventricules de rats nouveau-nés par les GPCR et par PdBu. PdBu provoque une forte stimulation de l'activité de JNK (fig 2), beaucoup plus puissante

que celle obtenue après traitement par ET-1. Nos résultats sont à l'opposé de ceux obtenus par Bogoyevitch et ses collaborateurs qui ont montré que la stimulation par ET-1 des myocytes cardiaques des rats nouveau-nés active la voie JNK, alors que le traitement par PMA n'a eu aucun effet (89). Le choix de l'ester de phorbol pourrait expliquer ce résultat. De plus la méthode expérimentale utilisée par Bogoyevitch était une immunoprécipitation de JNK avec un AC anti JNK1. Une étude récente de Ramirez et ses collaborateurs a démontré l'activation de JNK dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés traités par des agonistes  $\alpha_1$ -AR (PE), via le recrutement par Ras d'une MKK qui active préférentiellement JNK. L'implication de JNK dans l'hypertrophie cardiaque a été démontrée par l'utilisation d'un mutant MEKK constitutivement actif qui stimule l'expression du gène de l'ANF, tandis qu'un mutant dominant négatif MEKK inhibe cette expression (90). Choukroun et ses collaborateurs ont obtenu des résultats similaires en surexprimant des mutants actifs des composants de la voie JNK, et en utilisant des dominants négatifs qui inhibent l'activité de cette voie (171). Ces résultats sont à considérer avec discernement, car ils ne reflètent pas l'activation de la voie JNK dans l'hypertrophie cardiaque induite par des agents physiologiques. Jusqu'à ce jour, il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique adéquat d'un des composants de la cascade JNK, ce qui limite les recherches utilisant des stimuli hypertrophiques physiologiques.

L'intérêt pour la voie p38 MAPK est récent. Dans le cœur intact la voie p38 est activée par l'ischémie, l'ischémie/reperfusion (92,94) et par le stress oxydatif (196). Deux groupes de chercheurs ont suggéré l'implication de la voie p38 MAPK dans le développement du phénotype hypertrophique dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés. La transfection de formes constitutivement actives MKK6 (96,95) ou MKK3 (95) induisent des changements transcriptionnels et morphologiques associés

à la réponse hypertrophique (augmentation de la taille des cellules, expression du gène de l'ANF et réorganisation des sarcomères). Dans cette étude, nous avons également démontré l'activation de la voie p38 MAPK dans les myocytes des ventricules de rats nouveau-nés, stimulés par ET-1, NE et PdBu. Cette activation conduit à l'activation de MAPKAPK-2, substrat de p38 MAPK (76) résultant en une augmentation de la phosphorylation de hsp 27, petite protéine de choc thermique qui joue un rôle dans la protection du cytosquelette, et qui est un substrat non spécifique de MAPKAPK-2 (76). Nous avons observé l'activation de la voie p38 MAPK après 5 min d'exposition des myocytes cardiaques aux agonistes hypertrophiques (fig 3a). Comme pour les voies ERK et JNK, la voie p38 est puissamment activée par PdBu, tandis que les stimulations par ET-1 et NE sont plus faibles. Un seul pic d'activité de MAPKAPK-2 stimulée par PdBu a été détecté dans les fractions séparées sur colonne Mono S. Ce résultat suggère que l'activité de l'isoforme de MAPKAPK-2 présente dans la Mono S soit insensible à la stimulation par les GPCR. À notre connaissance, cette étude est la première à avoir démontré l'activation par les esters de phorbol de la voie p38 MAPK. Une étude de Clerk et collaborateurs montre l'activation de la voie p38 par ET-1 et PE dans les myocytes de ventricules de rats nouveau-nés (97), ces résultats sont en accord avec nos propres observations. Pour explorer le rôle de la voie p38 MAPK dans l'hypertrophie des myocytes cardiaques, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie. SB-203580 est un puissant inhibiteur des isoformes p38  $\alpha/\beta$  MAPK, mais pas des deux autres membres p38  $\gamma/\delta$  MAPK. Nous avons tout d'abord démontré que la stimulation des myocytes cardiaques des ventricules des rats nouveau-nés par ET-1, NE et PdBu pendant 24 h augmente la synthèse protéique, qui est considérée comme un des traits caractéristiques de l'hypertrophie cardiaque. Cependant, le traitement des cellules

par SB-203580 n'a eu aucun effet sur la synthèse protéique induite par ces agonistes. De plus, nous avons pu vérifier que le traitement des myocytes cardiaques par 10  $\mu$ M SB-203580 bloque complètement l'activité de p38 stimulée par NE. Ces résultats démontrent que l'activation de la voie p38 MAPK sensible au SB-203580 n'est pas nécessaire dans l'induction de la synthèse protéique stimulée par NE, ET-1 et PdBu. Ces observations vont dans le même sens que l'étude de Choukroun et collaborateurs qui ont montré que SB-203580 ne bloque pas la synthèse protéique induite par ET-1 et n'a aucun effet sur l'organisation des sarcomères (171). Plusieurs études suggèrent que l'effet de Ras dans la réponse hypertrophique est médié via l'activation des voies JNK et/ou p38 MAPK (90,96,95). Nous avons pu vérifier que la voie p38 MAPK activée par les agonistes des GPCR ainsi que les activateurs de la PKC (PdBu) n'était pas nécessaire à la croissance des myocytes cardiaques. La voie JNK/SAPK pourrait donc être la voie des MAPK impliquée dans le processus hypertrophique. Notre étude a essentiellement concerné un des traits caractéristique de la réponse hypertrophique qui est la synthèse protéique. D'autres investigations sont nécessaires pour explorer l'expression des gènes spécifiques de l'hypertrophie cardiaque comme l'ANF. On ne peut donc éliminer l'implication des voies MAPK dans la régulation de l'expression de ces gènes.

#### **4.1.2 Modulation de l'expression de MAPK phosphatase-1 (MKP-1) par l'oxyde nitrique**

Un des mécanismes d'action du NO est d'activer la guanylate cyclase soluble, ce qui a pour effet de provoquer une augmentation de la production du GMPc. Le NO exerce un effet inhibiteur sur la croissance de plusieurs types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses aortiques (182), les cardiomyocytes et les fibroblastes

cardiaques (184), et cet effet est médié par le GMPc. Le mécanisme d'action du second messenger GMPc sur l'inhibition de la prolifération demeure indéterminé. Les voies MAPK participent à la croissance de plusieurs types cellulaires. Au cours de l'hyperplasie des fibroblastes cardiaques stimulée in vitro par AII, les voies MAPK ERK1/2 sont activées (200) ce qui a permis de suggérer leur implication dans la croissance cellulaire. En tenant compte du rôle antiprolifératif de GMPc, nous avons envisagé la possibilité d'une régulation de l'activité de ERK par NO, via la modulation de l'expression de MKP-1. L'activité de ERK1/2 est régulée par les protéines phosphatases doublement spécifiques, parmi elles on reconnaît MKP-1 et MKP-2 qui sont plus spécifiques de ERK1/2 (101,102). Brondello et collaborateurs ont démontré que l'activation de ERK 1 dans les fibroblastes de poumon de hamster chinois (CCL39) était régulée à la baisse par l'induction de MKP-1 et de MKP-2 (105). Plusieurs autres études utilisant des fibroblastes NIH3T3 et d'autres types cellulaires montrent l'induction de MKP-1 par les MAPK JNK et/ou ERK1/2 (197,198,199). Nos résultats montrent l'induction par un donneur de NO (SNAP) de l'expression de l'ARNm de MKP-1, celle-ci est obtenue après 15 min d'exposition des cellules au SNAP, elle est maximale à 30 min et est maintenue entre 60 et 120 min. A notre connaissance, nos résultats sont les seuls à avoir montré l'induction par le NO de l'expression de MKP-1. Ces résultats suggèrent la modulation par le NO via la production de GMPc de l'expression de MKP-1. Dans ce cas l'activité de ERK1/2 dans les fibroblastes cardiaques pourrait être régulée par le GMPc. Toutefois l'hypothèse d'une autre voie MAPK impliquée dans l'hyperplasie fibroblastique peut être envisagée en tenant compte du fait que MKP-1 peut réguler à la baisse l'activité de JNK (103). Il est intéressant de noter que dans des myocytes cardiaques des rats nouveau-nés exposés à SNAP, on observe le même profil d'expression de MKP-1.

Calderone et ses collègues ont démontré l'inhibition de la prolifération des cardiomyocytes par cGMP, via le NO (184). Comme pour les fibroblastes cardiaques, cet effet pourrait s'exercer par la modulation de l'expression de MKP-1. Dans les myocytes cardiaques, on note également la présence d'une seconde bande de plus petite taille, celle-ci pourrait correspondre à l'expression d'une autre isoforme de MKP-1. Des expérimentations futures permettront l'identification de cette bande.

## 4.2 Conclusion

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertrophie cardiaque sont très complexes du fait des nombreuses voies de signalisations impliquées. Dans le cadre de cette étude nous avons démontré l'activation des trois voies de signalisations MAPK ERK JNK et p38, dans les myocytes cardiaques des rats nouveau-nés. L'exposition de ces cellules à des facteurs hypertrophiques tels que NE, ET-1 et PdBu active les voies MAPK, mais les effets comparés de ces trois agonistes démontrent une puissante stimulation par PdBu. Les trois agonistes augmentent la synthèse protéique, mais ce trait caractéristique de la réponse hypertrophique n'a pas été affecté par l'utilisation des inhibiteurs des voies MAPK ERK et p38. L'absence d'inhibition de l'incorporation de la  $^3\text{H}$  leucine dans les cellules, suggère que ni la voie ERK ni la voie p38 MAPK ne semblent participer au processus hypertrophique. Toutefois nous n'avons pas examiné les autres marqueurs de l'hypertrophie cardiaque. La voie JNK pourrait être un des mécanismes impliqués, mais de nombreuses investigations demeurent nécessaires pour élucider le rôle de JNK. Notre étude portait également sur la régulation indirecte de la voie MAPK ERK1/2 par le NO dans les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés. Le traitement des fibroblastes par SNAP, un donneur de NO, induit l'expression de MKP-1 une protéine phosphatase doublement spécifique qui, en déphosphorylant les résidus thréonine et tyrosine de ERK1/2, régule à la baisse son activité. Ce processus pourrait représenter un mécanisme de modulation de l'activité de ERK dans les cellules cardiaques par le second messager GMPc, qui exerce un effet antiprolifératif sur les fibroblastes cardiaques et les cardiomyocytes. Tous ces résultats ouvrent le champ à un large éventail d'investigations qui permettront l'élucidation de ce processus complexe de régulation des voies tyrosine kinases.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe, and G.L. Johnson. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79:143-180.
2. Cooper, J.A., D.F. Bowen-Pope, E. Raines, R. Ross, and T. Hunter. 1982. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 31:263-273.
3. Cooper, J.A. and T. Hunter. 1983. Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinases. *J Biol Chem* 258:1108-1115.
4. Ray, L.B. and T.W. Sturgill. 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 85:3753-3757.
5. Rossomando, A.J., D.M. Payne, M.J. Weber, and T.W. Sturgill. 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 86:6940-6943.
6. Boulton, T.G., G.D. Yancopoulos, J.S. Gregory, C. Slaughter, C. Moomaw, J. Hsu, and M.H. Cobb. 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64-67.
7. Boulton, T.G., S.H. Nye, D.J. Robbins, N.Y. Ip, E. Radziejewska, S.D. Morgenbesser, R.A. DePinho, N. Panayotatos, M.H. Cobb, and G.D. Yancopoulos. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.
8. Gonzalez, F.A., D.L. Raden, M.R. Rigby, and R.J. Davis. 1992. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett.* 304:170-178.
9. Zhou, G., Z.Q. Bao, and J.E. Dixon. 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270:12665-12669.
10. Lin, L.L., M. Wartmann, A.Y. Lin, J.L. Knopf, A. Seth, and R.J. Davis. 1993. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72:269-278.
11. Seger, R. and E.G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735.
12. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis. 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74:589-607.
13. Nguyen, T.T., J.C. Scimeca, C. Filloux, P. Peraldi, J.L. Carpentier, and O.E. Van. 1993. Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem* 268:9803-9810.

14. Gordon, R.D., I.A. Leighton, D.G. Campbell, P. Cohen, A. Creaney, D.C. Wilton, D.J. Masters, G.A. Ritchie, R. Mott, I.W. Taylor, K.R. Bundell, L. Douglas, J. Morten, and M. Needham. 1996. Cloning and expression of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) and a naturally occurring variant. Phosphorylation of Ser505 of recombinant cPLA2 by p42 mitogen-activated protein kinase results in an increase in specific activity. *Eur.J Biochem.* 238:690-697.
15. Chen, R.H., C. Sarnecki, and J. Blenis. 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915-927.
16. Ahn, N.G., D.J. Robbins, J.W. Haycock, R. Seger, M.H. Cobb, and E.G. Krebs. 1992. Identification of an activator of the microtubule-associated protein 2 kinases ERK1 and ERK2 in PC12 cells stimulated with nerve growth factor or bradykinin. *J Neurochem* 59:147-156.
17. Ahn, N.G., J.E. Weiel, C.P. Chan, and E.G. Krebs. 1990. Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 265:11487-11494.
18. Seger, R., D. Seger, F.J. Lozeman, N.G. Ahn, L.M. Graves, J.S. Campbell, L. Ericsson, M. Harrylock, A.M. Jensen, and E.G. Krebs. 1992. Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *J Biol Chem* 267:25628-25631.
19. Zheng, C.F. and K.L. Guan. 1993. Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 268:23933-23939.
20. Kosako, H., E. Nishida, and Y. Gotoh. 1993. cDNA cloning of MAP kinase kinase reveals kinase cascade pathways in yeasts to vertebrates. *EMBO J* 12:787-794.
21. Wu, J., J.K. Harrison, P. Dent, K.R. Lynch, M.J. Weber, and T.W. Sturgill. 1993. Identification and characterization of a new mammalian mitogen- activated protein kinase kinase, MKK2. *Mol Cell Biol* 13:4539-4548.
22. Zheng, C.F. and K.L. Guan. 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 13:1123-1131.
23. Alessi, D.R., Y. Saito, D.G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C.J. Marshall, and S. Cowley. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* 13:1610-1619.
24. Fukuda, M., I. Gotoh, M. Adachi, Y. Gotoh, and E. Nishida. 1997. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J Biol Chem* 272:32642-32648.
25. Bogoyevitch, M.A., C.J. Marshall, and P.H. Sugden. 1995. Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c- Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270:26303-26310.

26. Lange-Carter, C.A., C.M. Pleiman, A.M. Gardner, K.J. Blumer, and G.L. Johnson. 1993. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260:315-319.
27. Marais, R. and C.J. Marshall. 1996. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv* 27:101-125.
28. Dudley, D.T., L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, and A.R. Saltiel. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 92:7686-7689.
29. Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, H.W. Fries, J. Troppmair, and U.R. Rapp. 1994. The ins and outs of Raf kinases. *Trends.Biochem.Sci* 19:474-480.
30. Sugden, P.H. and A. Clerk. 1997. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein- coupled receptors. *Cell Signal.* 9:337-351.
31. Downward, J. 1996. Control of ras activation. *Cancer Surv* 27:87-100.
32. Howe, L.R., S.J. Leever, N. Gomez, S. Nakielny, P. Cohen, and C.J. Marshall. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71:335-342.
33. Aitken, A., D. Jones, Y. Soneji, and S. Howell. 1995. 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochem.Soc.Trans.* 23:605-611.
34. Reuther, G.W. and A.M. Pendergast. 1996. The roles of 14-3-3 proteins in signal transduction. *Vitam.Horm.* 52:149-175.
35. Mischak, H., T. Seitz, P. Janosch, M. Eulitz, H. Steen, M. Schellerer, A. Philipp, and W. Kolch. 1996. Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol* 16:5409-5418.
36. Storm, S.M., J.L. Cleveland, and U.R. Rapp. 1990. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 5:345-351.
37. Catling, A.D., C.W. Reuter, M.E. Cox, S.J. Parsons, and M.J. Weber. 1994. Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf- associated activity. *J Biol Chem* 269:30014-30021.
38. Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature* 373:573-580.
39. van, B.T., L.M. Luttrell, B.E. Hawes, and R.J. Lefkowitz. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr.Rev.* 17:698-714.
40. Gudermann, T., F. Kalkbrenner, and G. Schultz. 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 36:429-459.
41. Gupta, S.K., C. Gallego, G.L. Johnson, and L.E. Heasley. 1992. MAP kinase is constitutively activated in gip2 and src transformed rat 1a fibroblasts. *J Biol Chem* 267:7987-7990.

42. Faure, M., T.A. Voyno-Yasenetskaya, and H.R. Bourne. 1994. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 269:7851-7854.
43. Hawes, B.E., B.T. van, W.J. Koch, L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz. 1995. Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 270:17148-17153.
44. van, B.T., B.E. Hawes, D.K. Luttrell, K.M. Krueger, K. Touhara, E. Porfiri, M. Sakaue, L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz. 1995. Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway [see comments]. *Nature* 376:781-784.
45. Robinson, M.J. and M.H. Cobb. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr.Opin.Cell Biol* 9:180-186.
46. Posada, J. and J.A. Cooper. 1992. Molecular signal integration. Interplay between serine, threonine, and tyrosine phosphorylation. *Mol Biol Cell* 3:583-592.
47. Meloche, S., K. Seuwen, G. Pages, and J. Pouyssegur. 1992. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol.* 6:845-854.
48. Pages, G., P. Lenormand, G. Allemain, J.C. Chambard, S. Meloche, and J. Pouyssegur. 1993. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 90:8319-8323.
49. Seger, R., D. Seger, A.A. Reszka, E.S. Munar, H. Eldar-Finkelman, G. Dobrowolska, A.M. Jensen, J.S. Campbell, E.H. Fischer, and E.G. Krebs. 1994. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) and its mutants in NIH 3T3 cells. Evidence that MAPKK involvement in cellular proliferation is regulated by phosphorylation of serine residues in its kinase subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 269:25699-25709.
50. Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C.J. Marshall. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841-852.
51. Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, K. Ueki, T. Izumi, Y. Chatani, M. Kohno, M. Kasuga, Y. Yazaki, and Y. Akanuma. 1992. Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 267:20293-20297.
52. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, and M.E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAPK on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.
53. Gardner, A.M. and G.L. Johnson. 1996. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha- mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271:14560-14566.
54. Clerk, A., M.A. Bogoyevitch, M.B. Anderson, and P.H. Sugden. 1994. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen- activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269:32848-32857.

55. Bogoyevitch, M.A., P.E. Glennon, M.B. Andersson, A. Lazou, C.J. Marshall, and P.H. Sugden. 1993. Acidic fibroblast growth factor or endothelin-1 stimulate the MAP kinase cascade in cardiac myocytes. *Biochem.Soc.Trans.* 21:358S
56. Kyriakis, J.M. and J. Avruch. 1990. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 265:17355-17363.
57. Kyriakis, J.M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E.A. Rubie, M.F. Ahmad, J. Avruch, and J.R. Woodgett. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.
58. Derijard, B., M. Hibi, I.H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R.J. Davis. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.
59. Sanchez, I., R.T. Hughes, B.J. Mayer, K. Yee, J.R. Woodgett, J. Avruch, J.M. Kyriakis, and L.I. Zon. 1994. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372:794-798.
60. Tournier, C., A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R.J. Davis. 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 94:7337-7342.
61. Yan, M., T. Dai, J.C. Deak, J.M. Kyriakis, L.I. Zon, J.R. Woodgett, and D.J. Templeton. 1994. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372:798-800.
62. Blank, J.L., P. Gerwins, E.M. Elliott, S. Sather, and G.L. Johnson. 1996. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J Biol Chem* 271:5361-5368.
63. Hirai, S., M. Izawa, S. Osada, G. Spyrou, and S. Ohno. 1996. Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12:641-650.
64. Han, J., J.D. Lee, L. Bibbs, and R.J. Ulevitch. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
65. Han, J., J.D. Lee, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch. 1993. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem* 268:25009-25014.
66. Lee, J.C., J.T. Laydon, P.C. McDonnell, T.F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M.J. Blumenthal, J.R. Heys, and S.W. Landvatter. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.
67. Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, P.F. Di, R.J. Ulevitch, and J. Han. 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272:30122-30128.

68. Kumar, S., P.C. McDonnell, R.J. Gum, A.T. Hand, J.C. Lee, and P.R. Young. 1997. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 235:533-538.
69. Li, Z., Y. Jiang, R.J. Ulevitch, and J. Han. 1996. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAPK. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 228:334-340.
70. Mertens, S., M. Craxton, and M. Goedert. 1996. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 383:273-276.
71. Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes, and P. Cohen. 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J* 16:3563-3571.
72. Raingeaud, J., S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, and R.J. Davis. 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen- activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270:7420-7426.
73. McLaughlin, M.M., S. Kumar, P.C. McDonnell, H.S. Van, J.C. Lee, G.P. Livi, and P.R. Young. 1996. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 271:8488-8492.
74. Ludwig, S., K. Engel, A. Hoffmeyer, G. Sithanandam, B. Neufeld, D. Palm, M. Gaestel, and U.R. Rapp. 1996. 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol* 16:6687-6697.
75. Cuenda, A., J. Rouse, Y.N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T.F. Gallagher, P.R. Young, and J.C. Lee. 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* 364:229-233.
76. Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A.R. Nebreda. 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78:1027-1037.
77. Lavoie, J.N., H. Lambert, E. Hickey, L.A. Weber, and J. Landry. 1995. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 15:505-516.
78. Guay, J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J.N. Lavoie, J. Huot, and J. Landry. 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* 110 ( Pt 3):357-368.
79. Huot, J., F. Houle, F. Marceau, and J. Landry. 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ.Res* 80:383-392.

80. Raingeaud, J., A.J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard, and R.J. Davis. 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen- activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16:1247-1255.
81. Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, and G.M. Bokoch. 1995. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 270:23934-23936.
82. Manser, E., T. Leung, H. Salihuddin, Z.S. Zhao, and L. Lim. 1994. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367:40-46.
83. Bagrodia, S., B. Derijard, R.J. Davis, and R.A. Cerione. 1995. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen- activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 270:27995-27998.
84. Yamauchi, J., M. Nagao, Y. Kaziro, and H. Itoh. 1997. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J Biol Chem* 272:27771-27777.
85. Moriguchi, T., N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida, and M. Hagiwara. 1996. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* 271:13675-13679.
86. Tibbles, L.A., Y.L. Ing, F. Kiefer, J. Chan, N. Iscove, J.R. Woodgett, and N.J. Lassam. 1996. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J* 15:7026-7035.
87. Wang, X.S., K. Diener, D. Jannuzzi, D. Trollinger, T.H. Tan, H. Lichenstein, M. Zukowski, and Z. Yao. 1996. Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J Biol Chem* 271:31607-31611.
88. Verheij, M., R. Bose, X.H. Lin, B. Yao, W.D. Jarvis, S. Grant, M.J. Birrer, E. Szabo, L.I. Zon, J.M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R.N. Kolesnick. 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress- induced apoptosis. *Nature* 380:75-79.
89. Bogoyevitch, M.A., A.J. Ketterman, and P.H. Sugden. 1995. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270:29710-29717.
90. Ramirez, M.T., V.P. Sah, X.L. Zhao, J.J. Hunter, K.R. Chien, and J.H. Brown. 1997. The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 272:14057-14061.
91. Morooka, H., J.V. Bonventre, C.M. Pombo, J.M. Kyriakis, and T. Force. 1995. Ischemia and reperfusion enhance ATF-2 and c-Jun binding to cAMP response elements and to an AP-1 binding site from the c-jun promoter. *J Biol Chem* 270:30084-30092.

92. Bogoyevitch, M.A., J. Gillespie-Brown, A.J. Ketterman, S.J. Fuller, R. Ben-Levy, A. Ashworth, C.J. Marshall, and P.H. Sugden. 1996. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ.Res* 79:162-173.
93. Ward, S.G., R.V. Parry, J. Matthews, and L. O'Neill. 1997. A p38 MAP kinase inhibitor SB203580 inhibits CD28-dependent T cell proliferation and IL-2 production. *Biochem.Soc.Trans.* 25:304S
94. Yin, T., G. Sandhu, C.D. Wolfgang, A. Burrier, R.L. Webb, D.F. Rigel, T. Hai, and J. Whelan. 1997. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 272:19943-19950.
95. Wang, Y., S. Huang, V.P. Sah, J.J. Ross, J.H. Brown, J. Han, and K.R. Chien. 1998. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 273:2161-2168.
96. Zechner, D., D.J. Thuerauf, D.S. Hanford, P.M. McDonough, and C.C. Glembotski. 1997. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* 139:115-127.
97. Clerk, A., A. Michael, and P.H. Sugden. 1998. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol* 142:523-535.
98. Schafer, C., S.E. Ross, M.J. Bragado, G.E. Groblewski, S.A. Ernst, and J.A. Williams. 1998. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini. *J Biol Chem* 273:24173-24180.
99. Guan, K.L., S.S. Broyles, and J.E. Dixon. 1991. A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* 350:359-362.
100. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv.Cancer Res* 74:49-139.
101. Sun, H., C.H. Charles, L.F. Lau, and N.K. Tonks. 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75:487-493.
102. Duff, J.L., B.P. Monia, and B.C. Berk. 1995. Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. Effect of actinomycin D and antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 270:7161-7166.
103. Hirsch, D.D. and P.J. Stork. 1997. Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress- activated protein kinase pathways in vivo. *J Biol Chem* 272:4568-4575.

104. Muda, M., A. Theodosiou, N. Rodrigues, U. Boschert, M. Camps, C. Gillieron, K. Davies, A. Ashworth, and S. Arkinstall. 1996. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 271:27205-27208.
105. Brondello, J.M., A. Brunet, J. Pouyssegur, and F.R. McKenzie. 1997. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem* 272:1368-1376.
106. Keyse, S.M. and E.A. Emslie. 1992. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein- tyrosine phosphatase. *Nature* 359:644-647.
107. Muda, M., U. Boschert, A. Smith, B. Antonsson, C. Gillieron, C. Chabert, M. Camps, I. Martinou, A. Ashworth, and S. Arkinstall. 1997. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen- activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *J Biol Chem* 272:5141-5151.
108. Swynghedauw, B.E. 1990. Cardiac Hypertrophy and Failure. *Paris: INSERM*
109. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin.Invest* 56:56-64.
110. Morkin, E. 1970. Postnatal muscle fiber assembly: localization of newly synthesized myofibrillar proteins. *Science* 167:1499-1501.
111. Anversa, P., R. Ricci, and G. Olivetti. 1986. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol.* 7:1140-1149.
112. Gerdes, A.M., S.E. Campbell, and D.R. Hilbelink. 1988. Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas. *Lab Invest* 59:857-861.
113. Ruzicka, M., B. Yuan, E. Harmsen, and F.H. Leenen. 1993. The renin-angiotensin system and volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor versus angiotensin II receptor blocker. *Circulation* 87:921-930.
114. Chien, K.R., K.U. Knowlton, H. Zhu, and S. Chien. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037-3046.
115. Sugden, P.H. and A. Clerk. 1998. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 76:725-746.
116. Calderone, A., N. Takahashi, N.J.J. Izzo, C.M. Thaik, and W.S. Colucci. 1995. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* 92:2385-2390.
117. Arai, M., H. Matsui, and M. Periasamy. 1994. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ.Res* 74:555-564.

118. Simpson, P. 1983. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin. Invest* 72:732-738.
119. Iwaki, K., V.P. Sukhatme, H.E. Shubeita, and K.R. Chien. 1990. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem* 265:13809-13817.
120. Baker, K.M. and J.F. Aceto. 1990. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 259:H610-H618
121. Fedida, D., A.P. Braun, and W.R. Giles. 1993. Alpha 1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiol Rev.* 73:469-487.
122. Parker, T.G., S.E. Packer, and M.D. Schneider. 1990. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin. Invest* 85:507-514.
123. Morgan, H.E. and K.M. Baker. 1991. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83:13-25.
124. Terzic, A., M. Puceat, G. Vassort, and S.M. Vogel. 1993. Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol.Rev.* 45:147-175.
125. Schwinn, D.A., J.W. Lomasney, W. Lorenz, P.J. Szklut, R.T.J. Fremeau, T.L. Yang-Feng, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, and S. Cotecchia. 1990. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1- adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem* 265:8183-8189.
126. Stewart, A.F., D.G. Rokosh, B.A. Bailey, L.R. Karns, K.C. Chang, C.S. Long, K. Kariya, and P.C. Simpson. 1994. Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ.Res* 75:796-802.
127. Cotecchia, S., D.A. Schwinn, R.R. Randall, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron, and B.K. Kobilka. 1988. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1- adrenergic receptor. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 85:7159-7163.
128. Voigt, M.M., J. Kispert, and H.M. Chin. 1990. Sequence of a rat brain cDNA encoding an alpha-1B adrenergic receptor. *Nucleic.Acids.Res* 18:1053
129. Lomasney, J.W., S. Cotecchia, W. Lorenz, W.Y. Leung, D.A. Schwinn, T.L. Yang-Feng, M. Brownstein, R.J. Lefkowitz, and M.G. Caron. 1991. Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A- adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem* 266:6365-6369.
130. Perez, D.M., M.T. Piascik, and R.M. Graham. 1991. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol.* 40:876-883.

131. Starksen, N.F., P.C. Simpson, N. Bishopric, S.R. Coughlin, W.M. Lee, J.A. Escobedo, and L.T. Williams. 1986. Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc protooncogene expression. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A.* 83:8348-8350.
132. Ikeda, U., Y. Tsuruya, and T. Yaginuma. 1991. Alpha 1-adrenergic stimulation is coupled to cardiac myocyte hypertrophy. *Am J Physiol* 260:H953-H956
133. Lee, H.R., S.A. Henderson, R. Reynolds, P. Dunnmon, D. Yuan, and K.R. Chien. 1988. Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem* 263:7352-7358.
134. Knowlton, K.U., M.C. Michel, M. Itani, H.E. Shubeita, K. Ishihara, J.H. Brown, and K.R. Chien. 1993. The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 268:15374-15380.
135. Kohl, C., W. Schmitz, H. Scholz, J. Scholz, M. Toth, V. Doring, and P. Kalmar. 1989. Evidence for alpha 1-adrenoceptor-mediated increase of inositol trisphosphate in the human heart. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 13:324-327.
136. Poggioli, J., J.C. Sulpice, and G. Vassort. 1986. Inositol phosphate production following alpha 1-adrenergic, muscarinic or electrical stimulation in isolated rat heart. *FEBS Lett.* 206:292-298.
137. Steinberg, S.F., L.M. Kaplan, T. Inouye, J.F. Zhang, and R.B. Robinson. 1989. Alpha-1 adrenergic stimulation of 1,4,5-inositol trisphosphate formation in ventricular myocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 250:1141-1148.
138. Lazou, A., S.J. Fuller, M.A. Bogoyevitch, K.A. Orfali, and P.H. Sugden. 1994. Characterization of stimulation of phosphoinositide hydrolysis by alpha 1-adrenergic agonists in adult rat hearts. *Am J Physiol* 267:H970-H978
139. Schluter, K.D. and H.M. Piper. 1992. Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 263:H1739-H1746
140. Haneda, T. and P.J. McDermott. 1991. Stimulation of ribosomal RNA synthesis during hypertrophic growth of cultured heart cells by phorbol ester. *Mol Cell Biochem.* 104:169-177.
141. Bell, D., K.D. Schluter, X.J. Zhou, B.J. McDermott, and H.M. Piper. 1995. Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 27:2433-2443.
142. Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, and T. Masaki. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [see comments]. *Nature* 332:411-415.
143. Suzuki, T., T. Kumazaki, and Y. Mitsui. 1993. Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 191:823-830.

144. Sakurai, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto, and T. Masaki. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor [see comments]. *Nature* 348:732-735.
145. Arai, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo, and S. Nakanishi. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor [see comments]. *Nature* 348:730-732.
146. Ishikawa, T., L.M. Li, O. Shinmi, S. Kimura, M. Yanagisawa, K. Goto, and T. Masaki. 1991. Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts. Developmental changes in mechanical responses and receptor subtypes. *Circ.Res* 69:918-926.
147. Sugden P H and Bogoyevitch M A. 1996. Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *Trends Cardiovasc Med* 6:87-94.
148. Hilal-Dandan, R., D.T. Merck, J.P. Lujan, and L.L. Brunton. 1994. Coupling of the type A endothelin receptor to multiple responses in adult rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol.* 45:1183-1190.
149. Shubeita, H.E., P.M. McDonough, A.N. Harris, K.U. Knowlton, C.C. Glembotski, J.H. Brown, and K.R. Chien. 1990. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 265:20555-20562.
150. Hilal-Dandan, R., K. Urasawa, and L.L. Brunton. 1992. Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 267:10620-10624.
151. Sugden, P.H., S.J. Fuller, J.R. Mynett, R.J. Hatchett, M.A. Bogoyevitch, and M.C. Sugden. 1993. Stimulation of adult rat ventricular myocyte protein synthesis and phosphoinositide hydrolysis by the endothelins. *Biochim.Biophys.Acta* 1175:327-332.
152. Ye, H., R.A. Wolf, T. Kurz, and P.B. Corr. 1994. Phosphatidic acid increases in response to noradrenaline and endothelin- 1 in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res* 28:1828-1834.
153. Bumpus, F.M., H. Scharwtz, and I.H. Page. 1957. Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotensin. *Science* 125:886-887.
154. Berk, B.C., V. Vekshtein, H.M. Gordon, and T. Tsuda. 1989. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13:305-314.
155. Geisterfer, A.A., M.J. Peach, and G.K. Owens. 1988. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ.Res* 62:749-756.
156. Sadoshima, J. and S. Izumo. 1993. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ.Res* 73:413-423.
157. Sadoshima, J. and S. Izumo. 1993. Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ.Res* 73:424-438.

158. Timmermans, P.B., P.C. Wong, A.T. Chiu, W.F. Herblin, P. Benfield, D.J. Carini, R.J. Lee, R.R. Wexler, J.A. Saye, and R.D. Smith. 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol.Rev.* 45:205-251.
159. Sasaki, K., Y. Yamano, S. Bardhan, N. Iwai, J.J. Murray, M. Hasegawa, Y. Matsuda, and T. Inagami. 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351:230-233.
160. Murphy, T.J., R.W. Alexander, K.K. Griendling, M.S. Runge, and K.E. Bernstein. 1991. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236.
161. Takai, Y., M. Yamamoto, M. Inoue, A. Kishimoto, and Y. Nishizuka. 1977. A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 77:542-550.
162. Parker, P.J., L. Coussens, N. Totty, L. Rhee, S. Young, E. Chen, S. Stabel, M.D. Waterfield, and A. Ullrich. 1986. The complete primary structure of protein kinase C--the major phorbol ester receptor. *Science* 233:853-859.
163. Dunmon, P.M., K. Iwaki, S.A. Henderson, A. Sen, and K.R. Chien. 1990. Phorbol esters induce immediate-early genes and activate cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 22:901-910.
164. Henrich, C.J. and P.C. Simpson. 1988. Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to alpha 1-adrenergic and phorbol ester stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* 20:1081-1085.
165. Bogoyevitch, M.A., P.E. Glennon, and P.H. Sugden. 1993. Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 317:271-275.
166. Bogoyevitch, M.A., P.E. Glennon, M.B. Andersson, A. Clerk, A. Lazou, C.J. Marshall, P.J. Parker, and P.H. Sugden. 1994. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen- activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269:1110-1119.
167. Lazou, A., P.H. Sugden, and A. Clerk. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem.J* 332 ( Pt 2):459-465.
168. Bogoyevitch, M.A., M.B. Andersson, J. Gillespie-Brown, A. Clerk, P.E. Glennon, S.J. Fuller, and P.H. Sugden. 1996. Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem.J* 314 ( Pt 1):115-121.
169. Thorburn, J., J.A. Frost, and A. Thorburn. 1994. Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy. *J Cell Biol* 126:1565-1572.

170. Gillespie-Brown, J., S.J. Fuller, M.A. Bogoyevitch, S. Cowley, and P.H. Sugden. 1995. The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 270:28092-28096.
171. Choukroun, G., R. Hajjar, J.M. Kyriakis, J.V. Bonventre, A. Rosenzweig, and T. Force. 1998. Role of the stress-activated protein kinases in endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin. Invest* 102:1311-1320.
172. Brilla, C.G., B. Maisch, and K.T. Weber. 1992. Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. *Eur. Heart J* 13 Suppl D:24-32.
173. Weber, K.T. and C.G. Brilla. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83:1849-1865.
174. Lindpaintner, K., N. Niedermaier, H. Drexler, and D. Ganten. 1992. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: does the cardiac renin-angiotensin system play a role? *J Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 1:S41-S47
175. van, K.C., J.F. Smits, J.P. Cleutjens, J.J. Debets, R.G. Schoemaker, B.H. Struyker, F.T. Bosman, and M.J. Daemen. 1991. DNA synthesis in the non-infarcted cardiac interstitium after left coronary artery ligation in the rat: effects of captopril. *J Mol Cell Cardiol.* 23:1245-1253.
176. Smits, J.F., K.C. van, R.G. Schoemaker, J.P. Cleutjens, and M.J. Daemen. 1992. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 20:772-778.
177. Booz, G.W. and K.M. Baker. 1995. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res* 30:537-543.
178. Zou, Y., I. Komuro, T. Yamazaki, S. Kudoh, R. Aikawa, W. Zhu, I. Shiojima, Y. Hiroi, K. Tobe, T. Kadowaki, and Y. Yazaki. 1998. Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts. *Circ. Res* 82:337-345.
179. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
180. Garbers, D.L. 1992. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71:1-4.
181. Brady, A.J., J.B. Warren, P.A. Poole-Wilson, T.J. Williams, and S.E. Harding. 1993. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 265:H176-H182
182. Garg, U.C. and A. Hassid. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin. Invest* 83:1774-1777.

183. Dhaunsi, G.S., C. Matthews, K. Kaur, and A. Hassid. 1997. NO increases protein tyrosine phosphatase activity in smooth muscle cells: relationship to antimitogenesis. *Am J Physiol* 272:H1342-H1349
184. Calderone, A., C.M. Thaik, N. Takahashi, D.F. Chang, and W.S. Colucci. 1998. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin. Invest* 101:812-818.
185. Liu, Y., M. Gorospe, C. Yang, and N.J. Holbrook. 1995. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. *J Biol Chem* 270:8377-8380.
186. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
187. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
188. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
189. Stokoe, D., K. Engel, D.G. Campbell, P. Cohen, and M. Gaestel. 1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 313:307-313.
190. Stokoe, D., D.G. Campbell, S. Nakielny, H. Hidaka, S.J. Leever, C. Marshall, and P. Cohen. 1992. MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J* 11:3985-3994.
191. Alessi, D.R., A. Cuenda, P. Cohen, D.T. Dudley, and A.R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen- activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.
192. Thorburn, A., J. Thorburn, S.Y. Chen, S. Powers, H.E. Shubeita, J.R. Feramisco, and K.R. Chien. 1993. HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy [published erratum appears in *J Biol Chem* 1993 Jul 25;268(21):16082]. *J Biol Chem* 268:2244-2249.
193. Fuller, S.J., J. Gillespie-Brown, and P.H. Sugden. 1998. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 273:18146-18152.
194. Post, G.R., D. Goldstein, D.J. Thuerauf, C.C. Glembotski, and J.H. Brown. 1996. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem* 271:8452-8457.
195. Thorburn, J., M. Carlson, S.J. Mansour, K.R. Chien, N.G. Ahn, and A. Thorburn. 1995. Inhibition of a signaling pathway in cardiac muscle cells by active mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Biol Cell* 6:1479-1490.

196. Clerk, A., A. Michael, and P.H. Sugden. 1998. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem.J* 333 ( Pt 3):581-589.
197. Cook, S.J., J. Beltman, K.A. Cadwallader, M. McMahon, and F. McCormick. 1997. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca<sup>2+</sup>-dependent signal pathways in Rat-1 cells. *J Biol Chem* 272:13309-13319.
198. Bokemeyer, D., A. Sorokin, M. Yan, N.G. Ahn, D.J. Templeton, and M.J. Dunn. 1996. Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *J Biol Chem* 271:639-642.
199. Begum, N., L. Ragolia, J. Rienzie, M. McCarthy, and N. Duddy. 1998. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by insulin in vascular smooth muscle cells. Evaluation of the role of the nitric oxide signaling pathway and potential defects in hypertension. *J Biol Chem* 273:25164-25170.
200. Colombo, F., J. Noël, P. Mayer, and A. Calderone. 1999. Isoproterenol promote DNA synthesis in rats cardiac fibroblast via the recrutement of p21 and PI3K dependent signaling pathway. Soumis à *Biochemical Journal*.
201. Chevalier, D and B. G. Allen. 1999. Two distinct forms of MAKAP Kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes. Soumis à *J Biol Chem*.
202. Calderone, A., N. Abdelaziz, F. Colombo, K. L. Schreiber and H. Rindt. 1999. A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocytes hypertrophy and gene expression. En révision à *J Mol Cell Cardio*