

2m11. 2824. 2

Université de Montréal

VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LE REMODELAGE
HYPERTROPHIQUE VASCULAIRE

par

Christine Daigle

Faculté de Pharmacie

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

juin 2000

© Christine Daigle, 2000



2011.08.24.12

Université de Montréal

VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LE REMODELAGE
HYPERTROPHIQUE VASCULAIRE

QV
705
158
2000
N. 014

par
Christine Daigle
Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en sciences pharmaceutiques

avec option pharmacologie

(juin 2000)

Christine Daigle, 2000



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LE REMODELAGE
HYPERTROPHIQUE VASCULAIRE

présenté par :

Christine Daigle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Présidente du jury : Sylvie Marleau

Directeur de recherche : Pierre Moreau

Examineur(e) externe : Rhian Touyz

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

L'Angiotensine II (Ang II) est une hormone peptidique impliquée dans la régulation de la pression artérielle et de l'équilibre électrolytique. En plus de ces effets physiologiques classiques, des études ont démontré que l'Ang II provoque une hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de façon indépendante à ses effets sur la pression artérielle. La réponse hypertrophique est causée, entre autres, par une augmentation du taux de synthèse protéique dans la cellule (la synthèse protéique étant un élément précurseur de l'hypertrophie vasculaire). Ce mécanisme sert de marqueur pour qualifier et quantifier les effets hypertrophiques de l'Ang II sur les cellules cibles. Nos conditions expérimentales *in vivo* démontrent qu'effectivement, l'Ang II provoque une augmentation significative de la synthèse protéique dans les vaisseaux sanguins.

Il est bien connu que l'Ang II exerce ses effets physiologiques par l'intermédiaire de deux sous-types de récepteurs (AT₁ et AT₂), en activant diverses voies de signalisation intracellulaires. L'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs AT₁ (irbésartan) nous a permis de confirmer que la réponse hypertrophique observée dans les artères est dépendante de l'activation des récepteurs AT₁.

Des études *in vitro* ont démontré qu'au moins deux voies de signalisation, ERK-1/2 et P70^{S6K}, sont directement reliées à la synthèse protéique induite par l'Ang II. Cependant, les mécanismes de signalisation aboutissant à cette réponse hypertrophique *in vivo* ne sont pas encore connus. L'objectif principal de cette étude est de déterminer la contribution de ces voies dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II *in vivo*. L'administration de divers inhibiteurs sélectifs de ces voies nous a permis de déterminer leur implication essentielle dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II. En effet, nos résultats obtenus dans des conditions *in vivo* démontrent que l'Ang II stimule l'activité de ERK-1/2 dans les CMLV et que l'administration du PD98059, un inhibiteur spécifique de l'activation de ERK-1/2, inhibe la synthèse protéique induite par l'Ang II, principalement dans l'aorte et le cœur. Pour sa part, le PP2, un inhibiteur sélectif des tyrosine kinases c-Src, inhibe la synthèse protéique induite par l'Ang II dans l'aorte, le mésentère et le cœur. De

même, l'administration de la rapamycine, inhibant l'activité de la P70^{S6K}, inhibe la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les trois tissus étudiés. À la lumière de nos connaissances, cette étude démontre pour la première fois, dans des conditions *in vivo*, qu'il existe une hétérogénéité vasculaire quant aux voies de signalisation empruntées par l'Ang II pour mener à l'hypertrophie.

Bien que nos études démontrent un rôle des voies ERK-1/2, c-Src et P70^{S6K} dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II, il semble que le fait de bloquer plus en amont dans la cascade d'événements, soit au niveau du récepteur AT₁, provoque une inhibition beaucoup plus marquée de la synthèse protéique induite par l'Ang II. En conclusion, nos études ont permis de montrer la contribution des voies de signalisation dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II, et qu'une inhibition au niveau des récepteurs AT₁ serait plus efficace qu'une inhibition au niveau des voies de signalisation de l'Ang II pour atténuer l'hypertrophie vasculaire tant au niveau des petites artères de résistance qu'au niveau des grosses artères.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements	xv
Dédicace	xvi

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 LES VAISSEAUX SANGUINS.....	2
1.1.1 Structure des différentes couches cellulaires	2
1.1.2 Arbre et spécialisation des vaisseaux sanguins	6
1.1.2.1 Gros vaisseaux.....	6
1.1.2.2 Petits vaisseaux.....	7
1.1.2.3 Les capillaires	9
1.1.2.4 Les veines.....	9
1.2 L'ANGIOTENSINE II: STRUCTURE ET MÉTABOLISME	10
1.2.1 Système rénine-angiotensine (SRA).....	10
1.2.2. SRA circulant.....	12
1.2.3 SRA tissulaire	12
1.3 LES RÉCEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II.....	14
1.3.1 Récepteurs AT ₁	14
1.3.1.1 Clonage et structure	14
1.3.1.2 Distribution tissulaire.....	16
1.3.2 Récepteurs AT ₂	16
1.3.2.1 Clonage et structure	17
1.3.2.2 Distribution tissulaire.....	17
1.3.3 Antagonistes des récepteurs AT ₁ et AT ₂	20
1.4 LES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ANG II	21
1.4.1 Récepteurs AT ₁	21
1.4.1.1 Voies des phospholipases	24
1.4.1.2 La famille des tyrosine kinases Src	25

1.4.1.3 Les MAP kinases	27
1.4.1.3.1 Les voies p38 ^{MAPK} et JNK/SAPK.....	28
1.4.1.3.2 Les ERKs et mécanismes traductionnels	28
1.4.1.4 Voie de la PI ₃ -kinase	31
1.4.2 Récepteurs AT ₂	33
1.5 LES EFFETS CELLULAIRES ET ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'ANG II.....	35
1.5.1 Récepteurs AT ₁	35
1.5.1.1 Hypertrophie vasculaire.....	35
1.5.1.2 Hypertrophie cardiaque	38
1.5.1.3. Vasoconstriction	39
1.5.1.3. Aldostérone.....	40
1.5.2. Récepteurs AT ₂	41
1.6 LES IMPLICATIONS DE L'ANG II DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES.....	44
1.6.1 Hypertension	44
1.6.2 Athérosclérose.....	48
1.7 OBJECTIFS	49
CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	50
2.1 MODÈLE EXPÉRIMENTAL:	51
2.2. MESURE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE:	56
2.3 ANALYSE STATISTIQUE.....	58
CHAPITRE 3: RÉSULTATS.....	59
3.1 « SIGNALING EVENTS MEDIATING ANGIOTENSIN II-INDUCED VASCULAR PROTEIN SYNTHESIS IN VIVO	60
3.1.1 Abstract	61
3.1.2 Introduction.....	62
3.1.3. Materials and Methods	63
3.1.3.1. Animals and treatments:.....	63
3.1.3.2. Protein Synthesis Measurement.....	64
3.1.3.3 ERK-1/2 activity determination	65

3.1.3.4. Drugs and Statistical Analysis	66
3.1.4. Results.....	66
3.1.4.1. ERK-1/2 Pathway	66
3.1.4.2. Rapamycin-sensitive Pathway.....	68
3.1.4.3. AT ₁ Receptor Antagonism	68
3.1.5. Discussion	74
3.1.6. Limitations and Conclusion.....	77
3.1.7. Acknowledgements.....	78
3.1.8. References	79
3.2 LES TYROSINE KINASES SRC ET LEUR INHIBITEUR SÉLECTIF (PP2)	82
3.2.1 Introduction.....	82
3.2.2 Objectif	83
3.2.3 Méthodes et groupes expérimentaux.....	84
3.2.4 Résultats.....	84
3.2.4 Discussion	88
3.3 L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE	89
3.3.1 Introduction.....	89
3.3.2 Objectif	89
3.3.3 Méthodes et groupes expérimentaux.....	90
3.3.4 Résultats.....	90
3.3.5 Discussion	92
CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	93
CHAPITRE 5: BIBLIOGRAPHIE.....	99

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1.1 : Comparaison des sous-types des récepteurs à l'Ang II (AT ₁ et AT ₂)	19
Tableau 1.2 : Effets des récepteurs AT ₁ et AT ₂ de l'Ang II	43

CHAPITRE 3

Tableau 3.1 : Mean arterial pressure before and after drug administration	70
Tableau 3.2 : Protein synthesis in the aorta and mesenteric arteries of rats treated acutely with the AT ₁ -receptor antagonist Irbesartan	72

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1.1 : Structure et composition des différentes couches cellulaires d'une artère 3
- Figure 1.2 : Contrôle de la résistance périphérique en fonction de la taille des artères 8
- Figure 1.3 : Cascade de formation du système rénine-angiotensine (SRA) 11
- Figure 1.4 : Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II 15
- Figure 1.5 : Mécanismes de signalisation intracellulaire impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique par le récepteur AT₁..... 23

CHAPITRE 2

- Figure 2.1 : Schéma représentant le protocole expérimental pour l'administration intraveineuse (i.v.) des agents pharmacologiques (PD98059, rapamycine, PP2, irbésartan).. 53
- Figure 2.2 : Schéma représentant le protocole expérimental pour l'administration sous-cutanée (s.c.) de l'irbésartan..... 54
- Figure 2.3 : Mesure de la synthèse protéique 57

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Effect of ERK1/2 activity inhibition with PD98059 on protein synthesis rate in the aorta and small mesenteric arteries	67
Figure 3.2 : Western blot analysis of aortic protein samples	69
Figure 3.3 : Effect of Rapamycin on protein synthesis rate in the aorta and small mesenteric arteries	71
Figure 3.4 : Effect of Irbesartan (subcutaneous administration) on basal and angiotensin II-stimulated protein synthesis in the aorta and small mesenteric arteries	73
Figure 3.5 : Effets du PP2, un inhibiteur sélectif des tyrosine kinases Src, sur la synthèse protéique induite par l'Ang II au niveau de l'aorte	86
Figure 3.6 : Effets du PP2 sur la synthèse protéique induite par l'Ang II au niveau des petites artères méésentériques.....	87
Figure 3.7 Effets de divers agents pharmacologiques (doses maximales) sur la synthèse protéique induite par l'Ang II au niveau du ventricule gauche	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
Akt:	produit du proto-oncogène c-akt/protéine kinase B
AC:	adénylate cyclase
AMP _c :	adénosine monophosphate cyclique
Ang I:	angiotensine I
Ang II:	angiotensine II (octapeptide, 1-8)
Ang III:	angiotensine III (fragment 1-7)
Ang IV:	angiotensine IV (fragment 3-7)
ANP:	peptide natriurétique des oreillettes
ARN:	acide ribonucléique
ARN _m :	ARN messenger
AT ₁ :	sous-type AT ₁ des récepteurs de l'Ang II
AT ₂ :	sous-type AT ₂ des récepteurs de l'Ang II
ATP:	adénosine trisphosphate
AVP :	vasopressine ou hormone anti-diurétique
Bcl-2:	gène inhibiteur de l'apoptose
BFGF:	basic fibroblast growth factor
BK:	bradykinine
Ca ²⁺ :	calcium
[Ca ²⁺] _i :	concentration intracellulaire de Ca ²⁺
cdk:	cyclin-dependent kinase
CML:	cellules musculaires lisses
CMLV:	cellules musculaires lisses vasculaires
CNP:	peptide c-natriurétique
CSA:	cross-sectional area ou aire de section
Csk:	C-terminal Src kinase
c-Src:	pp60 ^{c-src} kinase
DAG:	1,2-diacylglycérol
DC:	débit cardiaque
d.i.:	diamètre interne

ECA:	enzyme de conversion de l'angiotensine I ou kininase II
EDHF:	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eIF4E:	facteur d'initiation de la traduction 4E des eucaryotes
4EBP:	eIF4E-binding protein
ERK-1/2:	extracellular signal-related kinases 1 (p44) and 2 (p42)
ET-1:	endothéline-1
FKBP:	FK 506 binding protein (produit semblable à la rapamycine)
FRAP:	FKBP-rapamycin associated protein
GDP:	guanosine disphosphate
GMP _c :	guanosine monophosphate cyclique
Grb-2:	growth factor receptor binding protein 2
GTP:	guanosine trisphosphate
IECA:	inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IP ₃ :	inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK:	c-Jun N-terminal kinase (SAPK)
kDa:	kiloDaltons
MAPK:	mitogen-activated protein kinase (ERK)
MEK-1/2:	MAP kinase kinase 1 et 2 ou ERK kinase
MEKK:	MEK kinase
MKP:	MAP kinase phosphatase
MNK-1:	MAP kinase interacting kinase-1
MTOR:	mammalian target of rapamycin
n:	nombre de sujets (rats)
Na ⁺ :	sodium
NO:	monoxyde d'azote
p38:	MAP kinase (mammalian homolog of HOG-1, a yeast kinase involved in the response to osmolar stress)
p62 ^{TCF} :	facteur de transcription ou ternary complex factor
P70 ^{S6K} :	kinase cytosolique qui phosphoryle la protéine S6 ribosomale (idem pour la p90 ^{RSK})
PDGF:	platelet-derived growth factor

PGH2:	prostaglandine H ₂
PGI ₂ :	prostaglandine I ₂ ou prostacycline
PI ₃ -K:	phosphatidylinositol 3-kinase
PIK:	phosphatidylinositol kinase-related kinases
PIP ₂ :	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKB:	protéine kinase B
PKC:	protéine kinase C
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PLC:	phospholipase C
PP2/PP1:	pyrazolopyrimidines (inhibiteurs de Src)
Prot G:	protéine liant le GTP
PTK:	proteïn tyrosine kinase
PTPase:	proteïn tyrosine phosphatase ou SHP-1
Raf-1:	MAP kinase kinase kinase
RAFT1:	rapamycin and FKBP12 target 1
Ras:	protéine de liaison nucléotide guanylique de 21kDa (petite protéine G) ou oncogène des virus des sarcomes murins (proto-oncogènes)
RCPG:	récepteurs couplés aux protéines G
RPV:	résistance périphérique vasculaire
RPT:	résistance périphérique totale
40S/60S:	sous-unités ribosomales
S6:	protéine ribosomale; composante de la sous-unité ribosomale 40S
SAPK:	stress-activated protein kinase
SH:	Src homology
SH2:	Src-homology domain 2
SH3:	Src-homology domain 3
Shc:	protéine adaptatrice (SH2-domain-containing α 2-collagen-related)
SHR:	spontaneous hypertensive rats
SNA:	système nerveux autonome
SNC:	système nerveux central

- SNS: système nerveux sympathique
- Sos: facteur échangeur de nucléotide guanylique, sous forme mammalienne de drosophile « Son of sevenless »
- SRA: système rénine-angiotensine
- Src: gène ancestral de l'oncogène du virus du sarcome de Rous (RSV) ou Rous sarcoma virus oncogene
- TXA₂: thromboxane A₂
- VIP: peptide vasoactif de l'intestin

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mes parents et autres membres de ma famille pour leur support, leur générosité, leur amour.

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr Pierre Moreau, pour ses précieux conseils, son dévouement, son sens pédagogique, son encadrement, et surtout, son respect et sa confiance envers moi. Je le remercie de m'avoir donné l'opportunité de participer à plusieurs congrès scientifiques, tant à l'échelle locale qu'internationale. Merci au Dr. Moreau ainsi que la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (SQHA) pour leur soutien financier pendant mes études graduées. Merci à toute l'équipe du laboratoire, plus particulièrement Mad. Louise Grondin, Fabrice Martens et Huy Hao Dao. Je désire également remercier Dr. Sylvie Marleau et Dr. Rhian Touyz d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire et d'y avoir apporté des commentaires constructifs.

Un gros merci à tous ceux et celles qui m'ont donné un coup de main au cours de ma maîtrise. Merci à Marie Roumi, Jean-François Bouchard, Daniel Lamontagne, Chantal Chulak et Patrice Hildgen pour leurs judicieux conseils.

Je tiens également à remercier Samuel LeBlanc, Claudie Paquet et Pascal Moreau, pour leur précieuse amitié, leur générosité et leur encouragement; je leur suis très reconnaissante.

À ce jour, ce travail aura été mon plus grand accomplissement académique. Rien n'égale le fait de se surpasser soi-même...

*Ce travail est dédié à la mémoire de Blanche Daigle,
qui fut et qui restera toujours une source
inestimable d'inspiration.*

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

L'étude des voies de signalisation peut s'avérer être très complexe étant donné qu'il s'agit d'un domaine de recherche assez récent, comportant encore plusieurs incertitudes quant à leurs mécanismes d'activation et leurs rôles physiologiques. C'est pourquoi l'élaboration de ce mémoire est structurée de façon à ce que les divers événements expliqués suivent un ordre logique. Ainsi, l'introduction débute par les caractéristiques des tissus pertinents à ce projet suivie par la description des signaux extracellulaires et intracellulaires pour finalement en arriver aux effets qui en découlent ainsi qu'à leur implication pathophysiologique.

1.1 LES VAISSEaux SANGUINS

1.1.1 Structure des différentes couches cellulaires

La paroi des vaisseaux du système cardiovasculaire est composée de différentes couches cellulaires distinctes successives (tuniques), chacune jouant un ou des rôle(s) spécifique(s). Les artères sont dotées de parois comprenant trois couches et d'une lumière (lumen) permettant la circulation sanguine. Ces couches sont, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau, l'intima (tunique interne), la média (tunique moyenne) et l'adventice (tunique externe) (voir figure 1.1).

L'intima est composée d'un revêtement endothélial (épithélium pavimenteux simple qui est continuellement en contact avec le sang), d'une membrane basale ainsi que d'une couche de tissu élastique nommée limitante élastique interne. L'endothélium est composé de cellules ayant une forme aplatie, d'apparence squameuse et agencées les unes aux autres sous forme de mosaïque; leur disposition varie selon leur emplacement et leur fonction. Les cellules endothéliales tapissent la surface interne du cœur, des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques, ainsi que la paroi des capillaires. L'épithélium adhère fermement au tissu conjonctif avoisinant par l'entremise de points d'attache à la membrane basale, qui est une mince couche extracellulaire composée d'un type spécial de collagène et de glycoprotéines. La membrane basale permet de maintenir l'épithélium en place et de le protéger des déchirures (1).

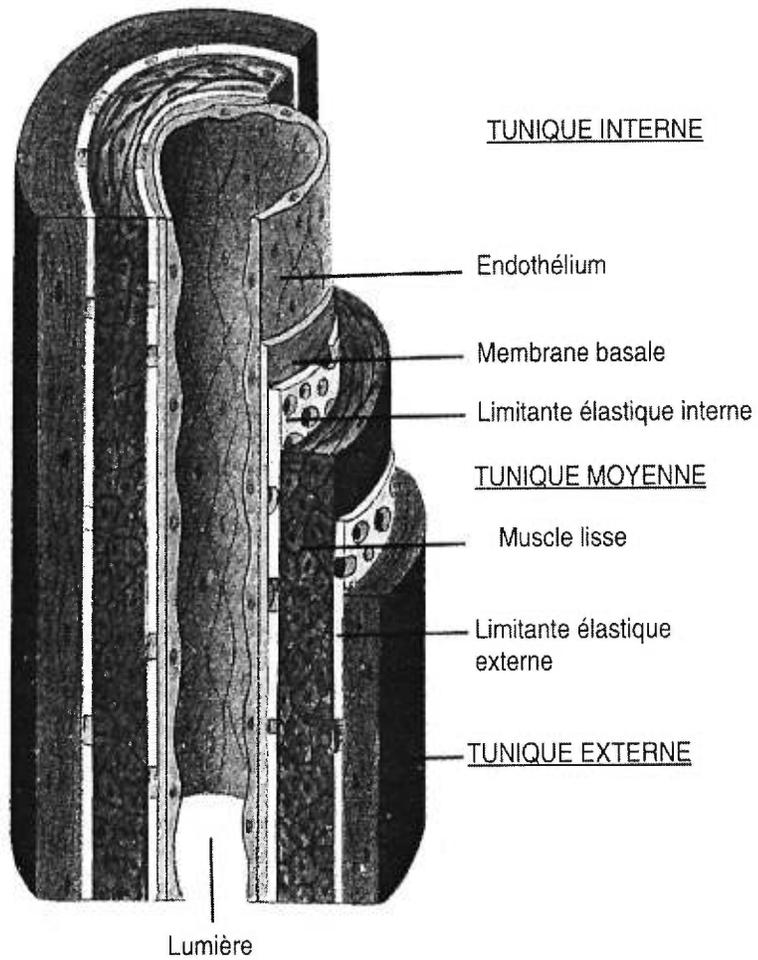


Figure 1.1: Structure et composition des différentes couches cellulaires d'une artère (tiré de Tortora et Grabowski, 1996).

En plus de son rôle de barrière entre le sang et la média, l'endothélium sécrète une variété de substances vasoactives qui modifient le diamètre des vaisseaux sanguins. Ces agents sont le monoxyde d'azote (NO: vasodilatateur), les prostaglandines (PGI₂: vasodilatateur ; PGH₂ et TXA₂: vasoconstricteurs), l'endothéline-1 (ET-1: vasoconstricteur), le peptide c-natriurétique (CNP: vasodilatateur), l'EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor: vasorelaxant) et possiblement l'Angiotensine II (Ang II: vasoconstricteur) ainsi que la bradykinine (BK: vasodilatateur) (2).

La couche intermédiaire que l'on nomme la média est la plus épaisse et la plus importante étant donné son rôle dans la réactivité vasculaire. Composée de tissu conjonctif, qui est formé, entre autres, de fibres élastiques jouant un rôle important dans la vasomotricité, la média est principalement composée de cellules musculaires lisses (CML) qui sont présentes dans les parois de tous les vaisseaux sanguins (sauf les capillaires). Les cellules de la média sont allongées de façon perpendiculaire à la lumière (un peu à la façon d'un beignet) et sont innervées par les branches sympathiques du système nerveux autonome (SNA). Le nombre de couches de CML dans la média diminue proportionnellement avec le diamètre du vaisseau. Par exemple, un vaisseau de 300 µm possède six couches de CML (3) alors qu'une artériole de 30-50 µm n'en possède qu'une seule (4, 5). Leur membrane cellulaire est liée en plusieurs endroits, permettant ainsi qu'une force générée dans une fibre musculaire puisse être transmise à la fibre adjacente. Ces points de liaison permettent aux ions de circuler librement d'une cellule à l'autre, permettant le passage d'un potentiel d'action et provoquant la contraction synchronisée des fibres musculaires (6). Les CML ont un cytoplasme constitué d'une quantité importante de myofilaments spécialisés dans la contraction cellulaire, incluant des isoformes spécifiques de l'actine (β -actine) et de myosine.

Des changements dans l'état contractile des CML provoquent des ajustements actifs dans le diamètre de la lumière vasculaire. En effet, la contraction du muscle lisse vasculaire est dotée d'un mécanisme de base (semblable aux autres types de muscles) qui comprend tout d'abord le développement d'une force et le rétrécissement des cellules dûs à l'interaction "cross-bridge" entre les filaments

intracellulaires composés de myosine et d'actine (protéines contractiles). La force de l'interaction entre ces filaments (d'où la source d'énergie est l'ATP) est déterminée par les niveaux de concentration de calcium libre intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$; une augmentation de ces niveaux est accompagnée d'une dépolarisation de la membrane cellulaire. De plus, l'amplitude du développement de la tension active est influencée par la longueur initiale du muscle (7). Ceci étant dit, la média est donc la couche cellulaire la plus importante en terme de vasomotricité grâce à sa structure et à sa composition, conférant aux artères deux propriétés très importantes: l'élasticité et la contractilité.

Il existe deux états de différenciation au niveau des cellules de la média. Le premier est le phénotype synthétique, caractéristique de la paroi vasculaire en phase de développement. Cet état de différenciation cellulaire est présent lors de la mise en culture primaire ou secondaire des CMLV, lors de la vasculogénèse chez le fœtus, et de façon importante dans certaines pathologies du système cardiovasculaire (lésions athérosclérotiques, hypertrophie cardiaque et resténose post-angioplastie). Le phénotype synthétique se caractérise par des CMLV sensibles aux agents mitogènes. Le deuxième état de différenciation des cellules de la média est le phénotype contractile, caractéristique d'une paroi vasculaire considérée comme étant mature. C'est le cas des cellules en stade final de différenciation. Ces cellules ne migrent pas, sont relativement insensibles aux agents mitogènes et répondent aux vasoconstricteurs comme les catécholamines, l'ET et l'Ang II (8). Ces cellules sont spécifiquement impliquées dans la régulation de la pression sanguine pouvant ainsi contrôler le diamètre des vaisseaux sanguins. Toutefois, en raison de leur grande souplesse, elles peuvent, dans certaines conditions, se différencier en un phénotype synthétique (8).

Finalement, la limitante élastique externe (entourant la média) donne place à la couche la plus externe nommée adventice ou externa, principalement composée de fibres élastiques et de fibres de collagène. Leur disposition en faisceaux leur confère une force considérable ainsi qu'une bonne résistance à la traction, tout en permettant une certaine souplesse. Elles permettent à l'adventice d'exercer un rôle de support externe.

1.1.2 Arbre et spécialisation des vaisseaux sanguins

Le système cardiovasculaire est formé d'un réseau comprenant différents types de vaisseaux sanguins suivant une forme arborescente. Ces segments vasculaires consécutifs se distinguent entre eux par leurs dimensions physiques, leurs caractéristiques morphologiques ainsi que par leurs fonctions. Ce système comprend les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines (9).

1.1.2.1 Gros vaisseaux

Pour des fins pratiques, les vaisseaux sanguins du système artériel peuvent être divisés en deux groupes principaux, le premier étant celui des gros vaisseaux de diamètre interne (d.i.) supérieur à 300 μm . Parmi ceux-ci, ce sont les artères qui possèdent les parois les plus épaisses, contenant, en plus du muscle lisse, une masse importante de fibres élastiques et de fibres de collagène. La fonction principale des artères est de transporter le sang, sous forte pression, du cœur jusqu'aux artérioles et capillaires (6). De plus, deux propriétés très importantes caractérisent les artères: l'élasticité et la contractilité. Comme le cœur se contracte et se relâche successivement, la vitesse du flux sanguin est irrégulière. La grande flexibilité des grosses artères leur permettent de tamponner les changements de pression en s'étirant lors de la systole et en regagnant leur géométrie lors de la diastole. Ces artères que l'on qualifie d'élastiques constituent un système permettant de réduire la pression pulsée. Il s'agit de l'aorte et du tronc artériel brachio-céphalique, de la carotide primitive, de l'artère sous-clavière, de l'artère vertébrale et des artères iliaques primitives. Ce premier groupe de vaisseaux comprend aussi les artères musculaires qui, comme leur nom l'indique, contiennent surtout des fibres musculaires et distribuent le sang aux diverses parties de l'organisme. Leur média contient plus de tissu musculaire que de fibres élastiques, et assure une meilleure vasoconstriction et vasodilatation pour ajuster le volume sanguin convenant aux besoins de la structure irriguée. Les artères musculaires ont un diamètre supérieur à 300 μm et comprennent les artères mésentériques, brachiales, radiales, intercostales, spléniques, fémorales, poplitées et tibiales.

1.1.2.2 Petits vaisseaux

Les vaisseaux sanguins appartenant au second groupe du système artériel sont les petits vaisseaux qui ont un diamètre interne inférieur à 300 μm . Plus précisément, il s'agit des petites artères (150-300 μm) et des artérioles (< 150 μm), ces dernières n'ayant qu'une seule couche de CML (10). Leur média contient surtout des CML et très peu de fibres élastiques, alors que leur adventice est composée principalement de fibres élastiques et de collagène. La paroi des artérioles étant principalement composée de fibres musculaires, elle leur permet de se fermer complètement ou de se dilater, permettant ainsi de modifier le flux sanguin se rendant aux capillaires en réponse aux besoins des tissus.

La résistance au flux sanguin est produite par la friction qui existe entre le sang et la paroi vasculaire. Ce phénomène dépend de différents facteurs dont: 1) la viscosité du sang, 2) la longueur totale du vaisseau et 3) le rayon moyen du vaisseau. Les deux premiers facteurs étant habituellement constants, ce sont les fluctuations au niveau du rayon vasculaire qui contribuent principalement à un changement de la résistance (2) (figure 1.2). Cette résistance au flux sanguin est prédominante au niveau des artérioles ainsi que dans les petites artères proximales telles que les artères pré-artériolaires (< 300 μm) (10, 11).

Ne pouvant être mesurée directement, la résistance est calculée à partir des variations du débit sanguin et des modifications de la pression artérielle, suivant la formule où la pression est égale au produit du débit cardiaque (DC) et de la résistance périphérique totale (RPT) dans le vaisseau ($\text{pression} = \text{DC} \times \text{RPT}$) (6). Par conséquent, la RPT se réfère à toutes les résistances vasculaires offertes par les vaisseaux sanguins systémiques. Les petites artères (artérioles et vaisseaux pré-artériolaires) ont donc un rôle important à jouer dans la régulation de la résistance périphérique (10).

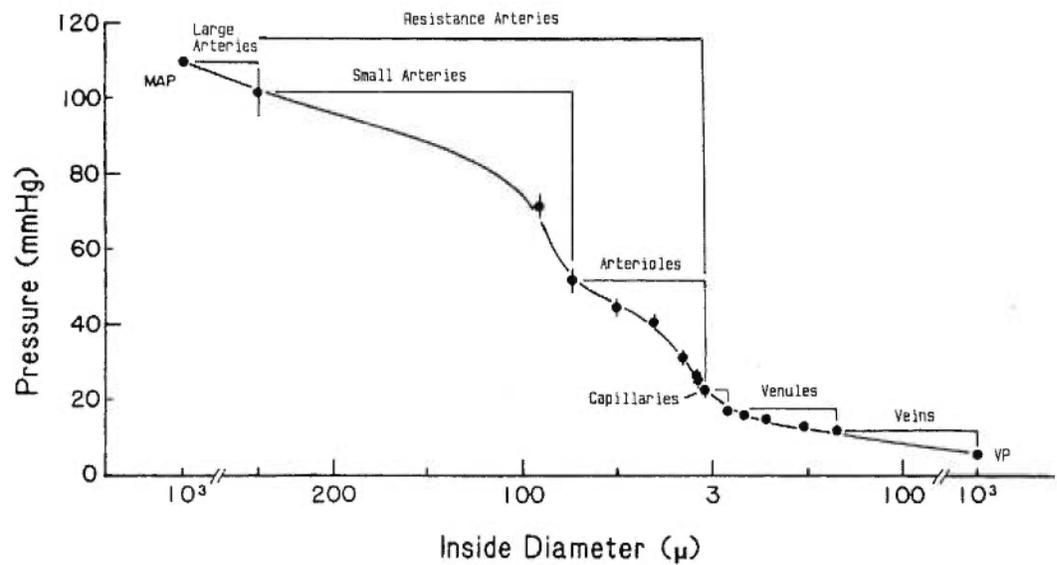


Figure 1.2: Contrôle de la résistance périphérique en fonction de la taille des artères. Les artères de résistances (petites artères et artérioles) contribuent majoritairement à la diminution de la pression artérielle, donc à la résistance vasculaire (tiré de Mulvany et Aalkjaer, 1990).

1.1.2.3 Les capillaires

Les capillaires, étant des vaisseaux microscopiques formés d'une seule couche de cellules endothéliales séparant le sang du fluide interstitiel, sont situés entre les artérioles et les veinules. L'absence de muscle lisse rend ces vaisseaux inaptes à modifier leur diamètre de façon active (7). Toutefois, les capillaires forment de vastes réseaux de ramifications qui augmentent la région de surface pour la diffusion et la filtration, permettant ainsi un échange rapide de grandes quantités de nutriments et de déchets (fluides, électrolytes, hormones et autres) entre le sang et les cellules tissulaires (6). Les réseaux capillaires les plus importants se trouvent dans les organes où l'activité métabolique est élevée (ex.: muscles, foie, reins, poumons et système nerveux) et qui nécessitent beaucoup d'oxygène et de nutriments. Lorsqu'un tissu est actif, comme dans le cas d'une contraction musculaire, le réseau de capillaires en entier se remplit de sang. Par ailleurs, dans les régions corporelles où l'activité métabolique est plus faible (ex.: tendons et ligaments), les capillaires sont beaucoup moins nombreux et le sang ne circule qu'à travers une partie limitée du réseau.

Lorsque plusieurs capillaires s'unissent, ils forment de petites veines que l'on nomme veinules. Les veinules les plus rapprochées des capillaires ont une intima composée d'endothélium et une média comprenant à peine quelques fibres musculaires lisses éparpillées (2). À mesure que les veinules convergent pour former les veines, la composition de leur paroi se complexifie.

1.1.2.4 Les veines

Les veines sont essentiellement composées des mêmes couches que les artères, sauf que leurs parois sont beaucoup plus minces; elles contiennent beaucoup moins de tissu élastique et de muscles lisses, et beaucoup plus de tissu fibreux. Cette différence est surtout observable au niveau de leur média, formée d'une seule couche de cellules musculaires, ainsi qu'au niveau de leur lumière qui est notamment plus large que celle d'une artère de diamètre externe comparable (9). De plus, la pression sanguine moyenne est considérablement plus basse que celle retrouvée dans les artères. La paroi des veines est toutefois suffisamment extensible (souple) pour s'adapter aux variations du volume sanguin, permettant d'emmagasiner un surplus sanguin en plus

ou moins grande quantité, dépendamment des besoins de l'organisme (6). Rappelons que le rôle principal des veines est de ramener le sang de la périphérie vers le cœur.

Par ailleurs, les parois des vaisseaux sanguins, qui ont besoin d'oxygène et d'éléments nutritifs comme tous les autres tissus de l'organisme, contiennent elles aussi des vaisseaux sanguins appelés vasa vasorum. Ces derniers sont des artérioles qui nourrissent la paroi des gros vaisseaux (12). Les vasa vasorum sont surtout présents dans les gros vaisseaux où les parois sont plus épaisses, permettant ainsi une meilleure diffusion des nutriments (13).

1.2 L'ANGIOTENSINE II: STRUCTURE ET MÉTABOLISME

1.2.1 Système rénine-angiotensine (SRA)

Les reins possèdent plusieurs fonctions essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. Ces derniers, plus précisément les néphrons, réabsorbent les substances dont l'organisme a besoin (glucose, acides aminés, ions et eau) et évacuent les autres (urée et acide urique, excès d'ions et d'eau). Les substances qui sont éliminées constituent l'urine, dont la formation comprends trois étapes: la filtration glomérulaire, la réabsorption et la sécrétion tubulaires. C'est au niveau de ces trois étapes que les reins (ou appareil juxtaglomérulaire) peuvent modifier le volume extracellulaire, contrôlant ainsi la pression artérielle. Cependant, les reins possèdent un autre moyen pour contrôler la pression artérielle dans tout l'organisme; il s'agit du système rénine-angiotensine (SRA). Le SRA est non seulement un système endocrine participant à la régulation de la pression artérielle et de l'équilibre hydro-sodé, mais aussi un système paracrine et autocrine (14). Les acteurs participant à cette cascade sont maintenant bien caractérisés (figure 1.3) (15).

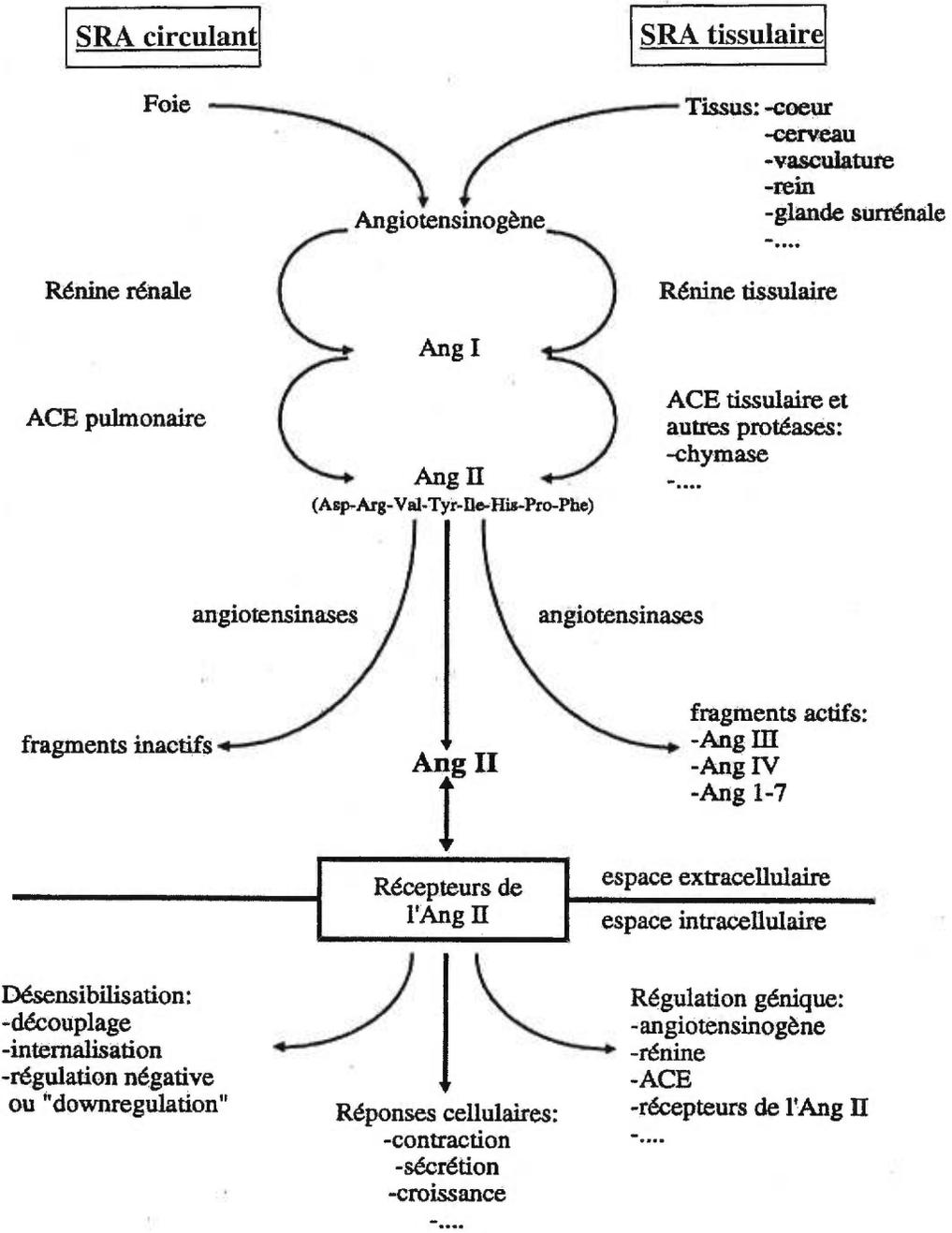


Figure 1.3: Cascade de formation du système rénine-angiotensine (SRA). Voir texte pour abréviations (modifié de Timmermans et al., 1993).

1.2.2. SRA circulant

Le SRA présent dans la circulation sanguine implique la rénine, une enzyme glycoprotéique (aspartyl protéase) qui est synthétisée, stockée et libérée par les cellules rénales juxtaglomérulaires (16). La rénine clive l'angiotensinogène (une protéine plasmatique α 2-globuline produite par le foie) en angiotensine I (Ang I), un décapeptide pharmacologiquement inactif. L'Ang I est ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, peptidyl-dipeptidase A ou kininase II), une protéase d'origine endothéliale retrouvée en très grande quantité dans les poumons. Cette dernière réaction provoque la formation de l'Ang II, un octapeptide actif qui se lie aux récepteurs à l'Ang II de sous-types AT₁ et AT₂ sur les cellules cibles. L'Ang II est un peptide de la classe des hormones vasoactives, qui comprend également les kinines, la vasopressine (AVP), le peptide natriurétique des oreillettes (ANP), le peptide vasoactif de l'intestin (VIP), la substance P et les catécholamines (17). Dans l'organisme, l'Ang II est rapidement transformée en Ang III, un heptapeptide qui, tout comme l'Ang II, stimule la sécrétion d'aldostérone, mais provoque une augmentation plus faible de la pression artérielle.

L'Ang II circulant possède un temps de demi-vie très court (10 à 20 secondes) en raison de la présence d'angiotensinases (peptidases ou protéases) qui clivent et inactivent l'angiotensine, produisant ainsi des fragments inactifs (18). La présence des angiotensinases ainsi que la désensibilisation réceptorielle font partie des mécanismes impliqués dans la cessation de leur activité (19).

1.2.3 SRA tissulaire

Malgré certaines évidences suggérant que l'Ang II est une hormone produite localement (20-22), il n'est pas encore connu si ceci est dû à la rénine tissulaire. En effet, toutes les composantes du SRA, sauf la rénine, semblent être synthétisés à l'intérieur des tissus. Des évidences plus récentes suggèrent que la rénine circulante, et non la rénine tissulaire, serait la source de production locale d'Ang II (23, 24).

Comparativement au SRA circulant, le SRA tissulaire contient non seulement l'ECA mais aussi d'autres protéases locales comme les chymases (absentes chez le

rat), qui peuvent transformer l'Ang I en Ang II (18). De plus, le SRA local ou tissulaire semble être régulé à la hausse lors de maladies cardiovasculaires. Tel est le cas pour le remodelage ventriculaire et l'insuffisance cardiaque post-infarctus, où l'expression de l'ECA est augmentée. La participation de composantes tissulaires du SRA est importante pour les effets physiologiques de l'Ang II, comme l'ont démontré certaines études suggérant que 90 à 99% de l'ECA chez l'homme est d'origine tissulaire alors qu'à peine 1 à 10 % se retrouve dans la circulation sanguine (25).

La formation de l'Ang II peut être bloquée à différents niveaux le long de sa cascade. Tout d'abord, il est possible d'inhiber l'activité de la rénine; toutefois, le développement des inhibiteurs de la rénine s'est avéré difficile et ceux-ci ne sont pas disponibles en clinique (26). Aussi, l'inhibition de l'activité de l'ECA a été une cible importante au cours des deux dernières décennies, faisant maintenant partie des nouvelles thérapies antihypertensives. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de l'ECA (IECA) ne donne pas une réponse optimale. En effet, après une administration chronique d'IECA, les niveaux plasmatiques d'Ang II tendent à revenir à leurs taux initiaux (27). Par ailleurs, il a été démontré que certaines voies alternatives contribuant à une normalisation des niveaux d'Ang II provoquent la formation de l'Ang II plasmatique et plus particulièrement l'Ang II tissulaire (28). Une des voies possibles implique une chymase, une enzyme humaine (29). D'autre part, la formation de l'Ang II peut également être bloquée au niveau de la liaison de l'Ang II avec ses récepteurs spécifiques par une variété d'antagonistes peptidiques et nonpeptidiques (voir section 1.3.3). Il a été démontré qu'un antagonisme au niveau du récepteur AT₁ est associé à une augmentation de l'activité plasmatique de la rénine, ainsi que des concentrations d'Ang I et d'Ang II (16).

1.3 LES RÉCEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II

Les effets biologiques de l'Ang II sur le système cardiovasculaire dépendent de sa liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. De nouveaux outils pharmacologiques et le clonage moléculaire ont permis de déterminer que l'Ang II se lie à au moins deux sous-types de récepteurs: AT₁ et AT₂ (30, 31) (voir figure 1.4). La distribution tissulaire des récepteurs AT₁ et AT₂ est variable selon l'espèce et le stade de développement. Depuis une dizaine d'années, la mise en évidence de ces sous-types de récepteurs ainsi que le développement d'inhibiteurs spécifiques ont permis de préciser les rôles respectifs des récepteurs AT₁ et AT₂ dans la transmission des effets de l'Ang II.

1.3.1 Récepteurs AT₁

Prédominant dans le système vasculaire, le récepteur de sous-type AT₁ médie la grande majorité des effets physiologiques de l'Ang II (32), un fait clairement établi par des études utilisant divers bloqueurs AT₁ (33, 34). Ces récepteurs possèdent une très forte affinité pour l'Ang II et sont couplés à plusieurs voies de signalisation dont celles des phospholipases C (PLC) (35, 36), l'activation des canaux calciques-dépendants du voltage (33) et l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) (15).

1.3.1.1 Clonage et structure

Le clonage moléculaire des séquences nucléotidiques codant les récepteurs à l'Ang II a permis d'inclure les récepteurs AT₁ à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (30, 31, 37). Deux séquences nucléotidiques codant deux récepteurs AT₁ distincts sur deux gènes différents ont été identifiés chez le rat et la souris, subdivisant ainsi les récepteurs AT₁ en deux sous-types: AT_{1A} et AT_{1B} (38, 39). Ces derniers n'existent cependant pas chez l'homme. Les deux isoformes du récepteur AT₁ (AT_{1A} et AT_{1B}) sont très semblables, partageant 95% d'homologie au niveau de leur séquence protéique. Aussi, les gènes codant pour les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B} seraient au nombre de trois chez le rat (40), et d'un seul pour le génome humain (41), la séquence codant pour le récepteur AT₁ humain étant connue (42).

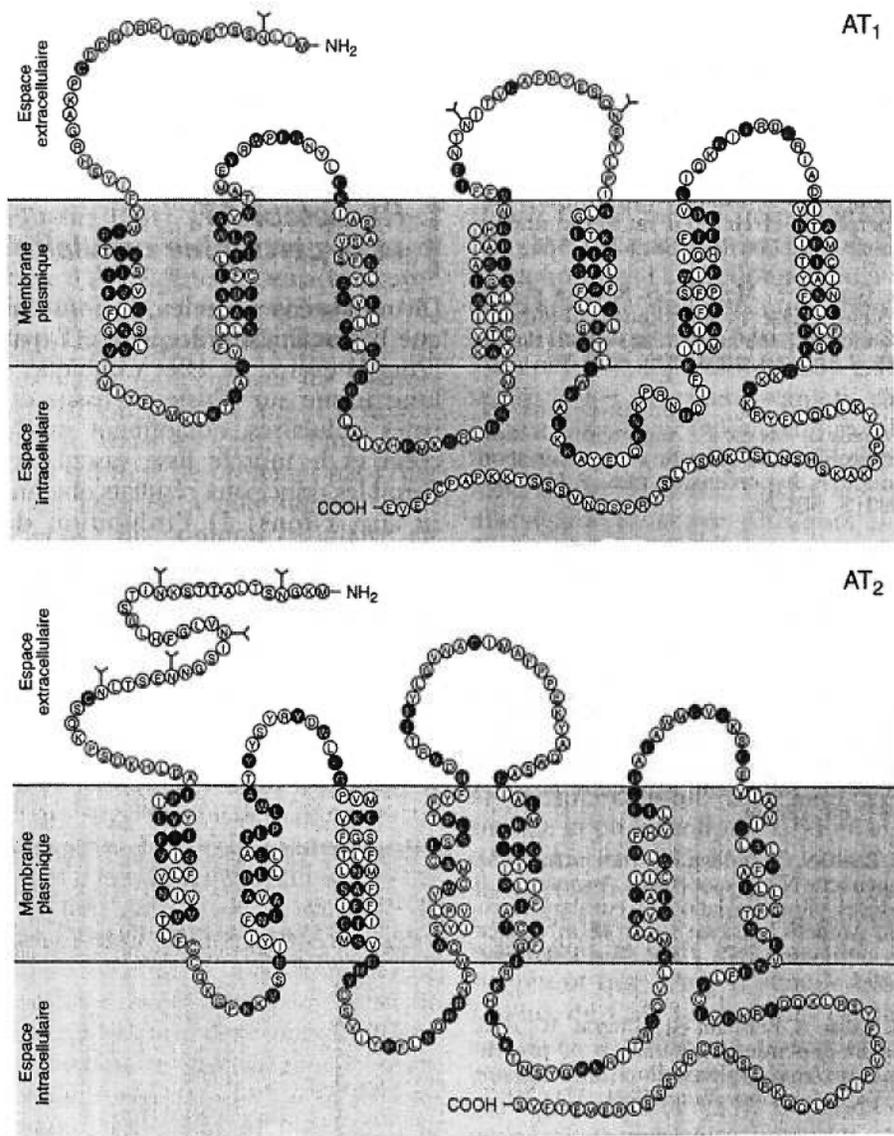


Figure 1.4: Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II (tiré de Chassagne et al. *Médecine/Sciences*, 12:1351-1360).

Le récepteur AT₁ est constitué de 359 acides aminés et sa masse moléculaire est d'environ 65 kDa chez le rat (43).

1.3.1.2 Distribution tissulaire

Chez l'homme et le rat, le récepteur AT₁ est exprimé dans plusieurs tissus et organes comprenant l'aorte, les artères pulmonaires et rénales, le cœur, les poumons, les cortex rénal et surrénal, le cerveau et le foie. La distribution tissulaire des sous-types AT_{1A} et AT_{1B} a été étudiée chez le rat adulte grâce à des techniques de biologie moléculaire telle que l'hybridation *in situ* (44). Celle-ci a révélé que le récepteur AT_{1A} est principalement exprimé au niveau des vaisseaux (CMLV), dans certaines zones distinctes du cerveau, dans le glomérule du rein, les poumons, le foie et la glande surrénale. Le récepteur AT_{1A} semble jouer un rôle important dans les actions rénales de l'Ang II. D'autre part, le récepteur AT_{1B} est synthétisé et exprimée au niveau de l'hypophyse, la zone glomérulée de la glande surrénale, le glomérule du rein et l'utérus des rongeurs (45-47). Peu d'informations existent concernant la fonction intra-rénale du récepteur AT_{1B}. Des évidences récentes effectuées dans la circulation systémique suggèrent que le récepteur AT_{1B} joue un rôle semblable à celui du récepteur AT_{1A} (48), toutefois, les fonctions rénales vasculaires ou tubulaires du récepteur AT_{1B} n'ont pas encore été explorées.

1.3.2 Récepteurs AT₂

Mis à part son rôle important dans le développement (embryogénèse), il existe relativement peu de données sur la contribution du récepteur AT₂ aux actions biologiques de l'Ang II, étant donné son faible degré d'expression comparativement aux récepteurs AT₁ (49). Néanmoins, certains résultats préliminaires ont montré que le récepteur AT₂ médie des effets anti-prolifératifs (50, 51). De plus, un rôle clé pour le récepteur AT₂ a été suggéré par des études montrant qu'une augmentation de son expression est associée à certains états pathologiques du système cardiovasculaire comme le diabète (52), l'ischémie (53), et l'hypertension (54). Tel que montré par une étude effectuée sur un modèle d'hypertension dépendante de la rénine chez le rat (Renal Wrap Hypertension Model), le récepteur AT₂ joue un rôle important dans l'hypertension rénovasculaire (55). Il s'agit d'un nouveau mécanisme par lequel

l'activation du récepteur AT₂ provoque une vasodilatation dite protectrice contre une augmentation additionnelle de la pression artérielle. Cet effet protecteur du récepteur AT₂ serait médié par la production rénale de BK, de NO et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), et aurait donc un rôle important pour limiter ou freiner l'hypertension rénovasculaire (55).

1.3.2.1 Clonage et structure

Tout comme pour les récepteurs AT₁, le clonage moléculaire des gènes codant pour le récepteur AT₂ a confirmé son appartenance à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, leur principale caractéristique étant leur couplage aux protéines G (protéines qui lient le GTP) (56). Les séquences nucléotidiques codant l'unique récepteur AT₂ ont été identifiées chez le rat (38, 39), la souris et l'homme (57). Le récepteur AT₂ est codé par un gène unique chez l'homme, dont le produit est une protéine de 363 acides aminés correspondant à une masse moléculaire théorique de 41 kDa. L'identité des séquences en acides aminés des récepteurs AT₂ varie de 92 à 99%. De plus, une comparaison entre la séquence du récepteur AT₂ et celle du récepteur AT₁ révèle une faible homologie, avec seulement de 33% de résidus identiques (voir figure 1.4) (58). Toutefois, les récepteurs AT₁ et AT₂ contiennent des séquences très conservées, susceptibles d'être impliquées dans la liaison du ligand. En dépit de ces homologies, le mode de signalisation du récepteur AT₂ semble atypique, différent de la majorité des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont couplés aux protéines G (RCPG).

1.3.2.2 Distribution tissulaire

Le récepteur AT₂ est majoritairement présent lors des premiers stades de développement embryonnaire. Chez le rat, le récepteur AT₂ est abondamment synthétisé dans les tissus mésenchymateux du fœtus, dans certaines régions du cerveau, dans les glomérules rénaux en cours de maturation (59) ainsi que dans le cœur et l'aorte au cours des premières semaines après la naissance (60, 61) (62). Malgré ces études montrant que la synthèse du récepteur AT₂ est plus restreinte chez l'adulte, une évidence plus récente effectuée par hybridation *in situ* suggère que l'ARN_m du récepteur AT₂ est également détectable chez le rat adulte (au niveau des

tubules distaux et glomérulaires) (59). Aussi, la synthèse du récepteur AT₂ est augmentée de façon significative au cours de divers processus tels que la cicatrisation cutanée (63), après désendothélialisation de la paroi vasculaire et au cours de l'hypertrophie ventriculaire gauche induite par une sténose de l'aorte thoracique (tableau 1.1) (64).

	Récepteurs AT ₁		Récepteurs AT ₂
Structure	7 domaines transmembranaires, 359 acides aminés		7 domaines transmembranaires, 363 acides aminés
Homologie inter-espèce	95%		92-99%
Masse moléculaire théorique	≈ 65 kDa		≈ 41 kDa
Isoformes	AT _{1A}	AT _{1B}	---
Espèces	Rongeurs Homme	Rongeurs	Rongeurs, Homme
Distribution tissulaire	- vaisseaux (CMLV) - rein - gl.surrénale - foie - poumon - cerveau	- hypophyse - utérus - rein - gl. surrénale	- foetus - cerveau - rein - glom. rénaux - cœur (en maturation)
Bloqueurs ou antagonistes	- Irbésartan (BMS-186295) - Losartan (DuP753) - Valsartan		- PD123319

Tableau 1.1: Comparaison des sous-types de récepteurs à l'Ang II (AT₁ et AT₂). Abréviations: gl:glande, glom:glomérule.

1.3.3 Antagonistes des récepteurs AT₁ et AT₂

Le développement d'antagonistes sélectifs aux récepteurs de l'Ang II a permis à la communauté scientifique d'acquies de nouvelles informations non seulement sur les rôles de ce peptide, mais aussi sur l'implication des récepteurs AT₁ et AT₂ dans diverses situations pathologiques comme l'hypertension et l'insuffisance cardiaque (15).

En utilisant différents antagonistes AT₁, certaines études ont montré que l'activation du récepteur AT₁ est une étape essentielle pour les effets vasculaires de l'Ang II (33, 34, 65). Il existe une variété d'antagonistes compétitifs des récepteurs AT₁ tels que le losartan (DuP 753) (66, 67) et le valsartan (68). Cependant, dans ce mémoire, nous nous attarderons à un antagoniste plus récent: l'irbésartan (SR 47436/BMS-186295) (69, 70), un tétrazole biphényle substitué non-peptidique. Cet antagoniste possède une grande sélectivité pour le récepteur de sous-type AT₁ (70), ainsi qu'un excellent profil pharmacocinétique apportant certains avantages par rapport aux autres agents de cette classe (71); par exemple, sa durée d'action est plus longue que le losartan et le valsartan. L'irbésartan induit une diminution de la pression artérielle chez les rats SHR (spontaneously hypertensive rats) (72), et est surtout reconnu comme étant un agent antihypertenseur cliniquement très efficace chez les patients hypertendus (73-76).

D'autre part, l'activation des récepteurs de sous-type AT₂ peut être sélectivement bloquée par le PD123319, un membre de la famille des tétrahydroimidazopyridines (15, 37, 77). Une étude effectuée chez des rats hypertendus, traités à l'Ang II, a montré qu'une inhibition chronique du récepteur AT₂ n'a pas d'effet sur la pression artérielle, mais inhibe l'effet de l'Ang II dans l'hypertrophie artérielle (78). Cette étude suggère que les effets vasotrophiques de l'Ang II *in vivo* sont partiellement médiés via les récepteurs AT₂ (78).

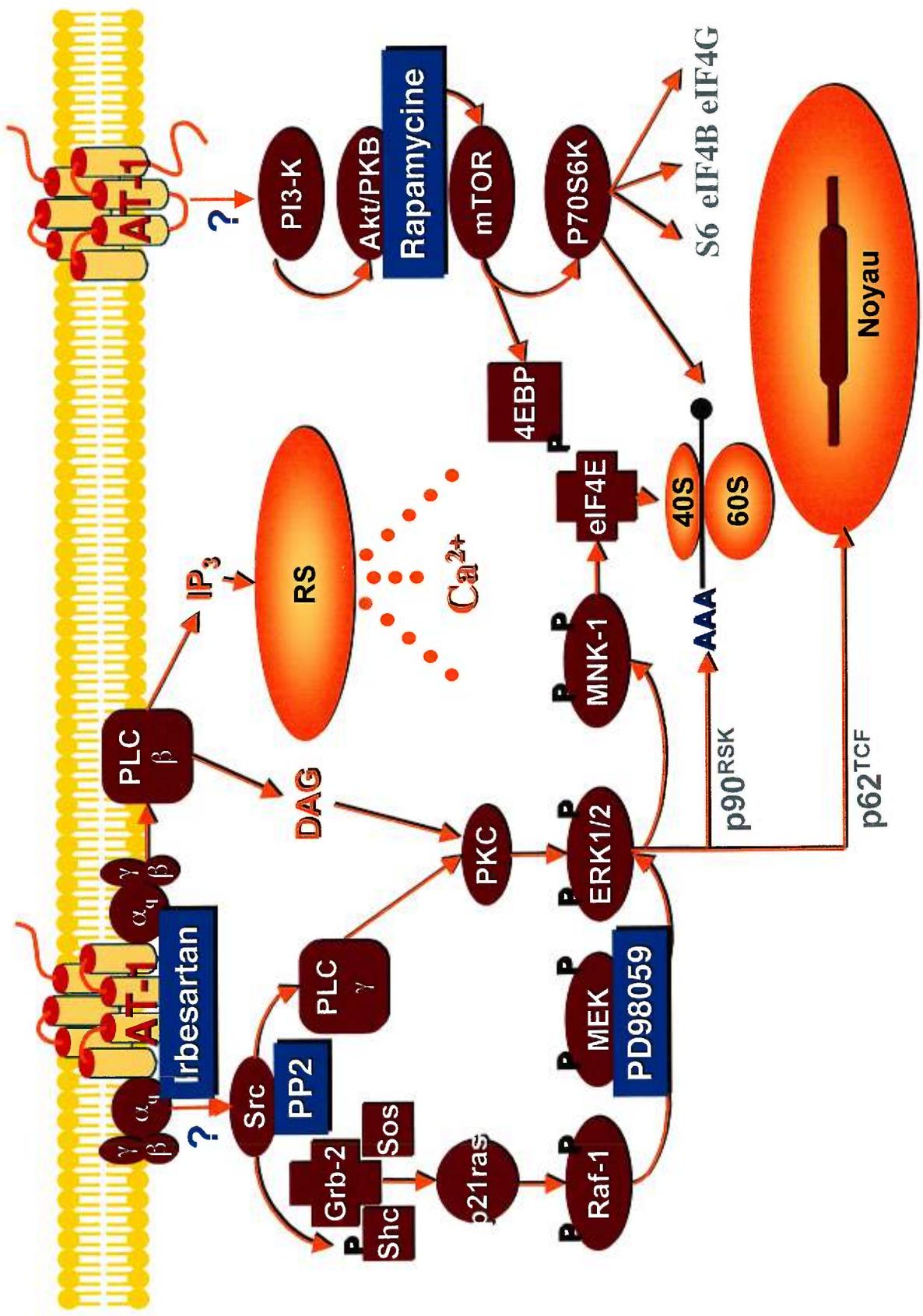
1.4 LES VOIES DE SIGNALISATION DE L'ANG II

1.4.1 Récepteurs AT₁

Dans les CMLV, la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ déclenche l'activation d'une série complexe d'événements de signalisation intracellulaire impliquant des phospholipases et des protéine kinases. Il s'agit d'un processus multiphasique, où les événements intracellulaires ont lieu à différents intervalles de temps (secondes, minutes, heures, jours). Les cascades de signalisation de l'Ang II intègrent et propagent les signaux extracellulaires vers les compartiments intracellulaires impliqués, entre autres, dans le contrôle de la synthèse protéique. Comme l'ont démontré certaines études *in vitro*, il existe au moins deux voies de signalisation directement reliées à la synthèse protéique; il s'agit des voies ERK-1/2 des MAP kinases et la P70^{S6K} (79-81). Toutefois, les mécanismes précis de leur activation restent à être définis. La figure 1.5 illustre les différentes possibilités d'activation de ces voies de signalisation ainsi que les inhibiteurs pharmacologiques de certaines kinases impliquées.

L'activation des voies de signalisation de l'Ang II a lieu par l'intermédiaire d'au moins deux classes de protéines G, soit G_q et G_i. Ces protéines sont constituées de 3 sous-unités polypeptidiques distinctes; la sous-unité α porte le site de liaison des nucléotides guanyliques (GDP et GTP) impliqués dans l'activation des effecteurs par la sous-unité α . En effet, la liaison d'un agoniste au récepteur AT₁ induit un changement de conformation favorable à son interaction avec la protéine G, ayant pour conséquence de réduire son affinité envers le GDP. Cet état favorise la liaison du GTP et la dissociation de l'hétérotrimère en sous-unité α -GTP activé et dimère $\beta\gamma$, chacun régularisant directement l'activité des effecteurs (phospholipases). Le mécanisme le mieux documenté est l'activation de la phospholipase C (PLC) via la protéine G_{αq} (82). Par ailleurs, les voies de signalisation dépendantes de G_i ne semblent pas impliquées dans l'effet stimulant de l'Ang II sur la synthèse protéique dans les CMLV (83).

Figure 1.5 : Mécanismes de signalisation intracellulaire impliqués dans le contrôle de la synthèse protéique par le récepteur AT₁. La liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ des CMLV provoque l'activation de plusieurs cascades de protéine kinases qui agissent de façon synergique pour augmenter la vitesse de la synthèse globale des protéines. Les voies ERK-1/2 des MAP kinases (activée par l'intermédiaire de la protéine G_{αq}) ainsi que la P70^{S6K} (dont les effecteurs cellulaires en amont ne sont pas bien connus) sont deux voies de signalisation directement impliquées dans la synthèse protéique. Tous les effecteurs cellulaires incluant les sérine/thréonine kinases, les kinases à double spécificité (MEK-1/2), les tyrosine kinases (Src), le facteur d'échange guanylique (SOS), les protéines adaptatrices (Grb2, Shc), les protéines membranaires (PLC-β) et les facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction (eIF4E, 4EBP) sont représentés en bourgogne. Les différents antagonistes et inhibiteurs pharmacologiques sont représentés en turquoise. Les ribosomes sont représentés par les sous-unités 40S/60S et la protéine G_q par le complexe hétérotrimérique αq-βγ. Abréviations: RS, réticulum sarcoplasmique; pour les autres, se référer au texte ou à la liste en début de mémoire. (Source: C. Daigle, 2000).



1.4.1.1 Voies des phospholipases

Les phospholipases font partie d'une série d'enzymes impliquées dans le métabolisme des phospholipides, jouant un rôle important dans la formation des seconds messagers. La famille de PLC comprend au moins trois isoformes: la PLC- β , la PLC- γ et la PLC- δ (84). Conventionnellement, les isoformes de la PLC- β sont régulées par les RCPG (comme le récepteur AT₁) (84) alors que les isoformes γ de la PLC sont régulées par les récepteurs de facteurs de croissance (85). Des études ont montré que suite à la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁, la protéine G_{αq} active l'isoforme β de la PLC (PLC- β), une voie classique et bien caractérisée (86). En effet, la PLC- β provoque l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) (87), donnant lieu à la formation de deux seconds messagers, le premier étant l'inositol trisphosphate (IP₃) et le second, le 1,2-diacylglycérol (DAG) (15, 39, 82, 88, 89). D'une part, l'IP₃ se lie à des récepteurs-canaux calciques spécifiques sur le réticulum sarcoplasmique pour libérer le Ca²⁺ des stocks intracellulaires [Ca²⁺]_i (90, 91). L'augmentation du [Ca²⁺]_i mène à une éventuelle contraction des CML (91). D'autre part, le DAG active à son tour des protéine kinases C (PKC) (92), qui regroupent différentes isozymes dont les sérine/thréonine kinases (93) soit dépendantes du Ca²⁺ et du DAG (les PKC classiques comme la PKC- α), soit indépendantes du Ca²⁺. Enfin, on retrouve aussi les PKC atypiques qui sont indépendantes du Ca²⁺ et du DAG pour leur activation (94). Chaque type cellulaire serait doté d'une combinaison de ces trois familles de PKC (95, 96). Mentionnons que l'activation des PKC par le DAG est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation de l'expression génétique, la croissance et la différenciation cellulaires (97-99). Puisque nous n'avons pas spécifiquement documenté l'implication de cette voie dans ce travail, sa discussion ne sera pas approfondie.

Des études subséquentes sont venues démontrer que l'Ang II stimule la phosphorylation en tyrosine de la PLC- γ 1 dans les CMLV (100-102). La régulation des isoformes de la PLC- δ n'est pas encore connue, mais pourrait impliquer des changements dans les [Ca²⁺]_i. Tout comme la PLC- β , la PLC- γ induit la formation d'IP₃, qui stimule l'augmentation transitoire de [Ca²⁺]_i (100), suivie d'un influx de

Ca^{2+} extracellulaire. Dans les CMLV, l'influx de Ca^{2+} extracellulaire est nécessaire à la contraction, à l'initiation de la synthèse d'ADN et à la prolifération cellulaire (103, 104). De plus en plus d'évidences suggèrent que l'activité protéine tyrosine kinase pourrait moduler l'augmentation des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ déclenchée par la stimulation des RCPG (100, 105-107).

Alors que la PLC- γ 1 est régulée par son association avec (et sa phosphorylation par) des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque, la PLC- β est l'isoforme requise pour les réponses aux protéines G. Cependant, certaines études indiquent l'absence de la PLC- β dans les CMLV en culture (100, 108, 109), alors que les isoformes γ et δ y sont détectées. Ces notions ont apporté des doutes sur son rôle dans la formation d'IP₃ après stimulation à l'Ang II (100). Le mécanisme par lequel le récepteur AT₁, un récepteur à sept domaines transmembranaires ne possédant pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, puisse induire une phosphorylation rapide en tyrosine de la PLC- γ 1 était encore mal compris. Toutefois, des études importantes plus récentes sont venues apporter de nouvelles connaissances à ce sujet, comme nous le verrons à la section suivante.

1.4.1.2 La famille des tyrosine kinases Src

Le schéma traditionnel d'activation des isoenzymes de la PLC- γ impliquait une phosphorylation en tyrosine de la PLC- γ par des facteurs de croissance (ex.: PDGF, EGF) (110). Cependant, des études récentes ont montré que la stimulation via le récepteur AT₁ de la phosphorylation en tyrosine de la PLC- γ et son activation dans les CMLV sont modifiées par un membre de la famille des protéines tyrosine kinases cytosoliques Src (102). Ces observations suggèrent que les membres de la famille Src auraient pour substrat la PLC- γ 1 (111) et seraient potentiellement associés au récepteur AT₁, ce dernier, rappelons-le, étant lié aux protéines G (112). Le récepteur AT₁ est lui-même phosphorylé en tyrosine, et sa queue cytosolique carboxy-terminale peut servir de substrat *in vitro* pour divers membres de la famille Src (113). Il s'agit d'une découverte importante étant donné que contrairement aux récepteurs classiques

des facteurs de croissance, le récepteur AT₁ n'a pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque (100, 102, 108, 114).

Les protéines tyrosine kinases cytosoliques activées par les récepteurs AT₁ comprennent les membres de la famille Src (pp60^{c-src} ou c-Src, p59^{fyn}, p56^{lck} et p62^{yes}) (113). Depuis quelques années, une importance particulière a été attribuée à cette famille qui semble être un médiateur important dans les événements de signalisation du récepteur AT₁. Les tyrosine kinases Src sont exprimées dans plusieurs types cellulaires et possèdent différentes isoformes. Alors que trois membres de cette famille (Fyn, c-Src et Yes) sont exprimés dans la plupart des tissus, seuls Fyn et c-Src sont exprimés dans les CMLV (115). L'isoforme la mieux caractérisée est c-Src (60-kD ou pp60^{c-src}) (116, 117).

Les résultats de travaux importants permettent de considérer Src comme étant le candidat le plus probable pour l'activation de la PLC par le récepteur AT₁. En effet, la c-Src provoque la phosphorylation en tyrosine ainsi que l'activation de la PLC- γ 1, menant à l'hydrolyse du PIP₂ et à la formation de l'IP₃ (100, 102, 118). Il a été démontré que l'administration par électroporation d'un anticorps anti-Src dans les CMLV inhibe la phosphorylation de la PLC- γ et la formation d'IP₃, suggérant un rôle critique de Src dans la signalisation de l'Ang II (102). De plus, la kinase c-Src serait responsable de l'activation de la PLC- γ 1, tel que démontré par une étude effectuée sur des plaquettes (119). Malgré ces évidences d'un lien entre Src et la voie reliant l'Ang II à la PLC- γ (102), les éléments se trouvant entre le récepteur AT₁ et Src ne sont pas encore connus. L'origine de l'activation c-Src pourrait possiblement impliquer de petites protéines G cytosoliques, ou encore le dimère $\beta\gamma$ de la protéine G associée au récepteur AT₁.

Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques des tyrosine kinases a permis d'effectuer une dissection rapide des voies de signalisation intracellulaires, et ce, en bloquant de façon spécifique un certain type ou une famille entière de tyrosine kinases. La génistéine est un inhibiteur efficace pour différents types de tyrosine kinases, provoquant une phosphorylation en tyrosine et empêchant la formation d'IP₃ en réponse à l'Ang II (102). Toutefois, cet inhibiteur est non-sélectif. Il existe une

autre classe d'inhibiteurs sélectifs envers les tyrosine kinases de la famille Src; il s'agit des pyrazolopyrimidines PP1 et PP2. Certaines études ont montré que le PP1 (CP-188,556) diminue sélectivement l'activité des kinases reliées à Src (pp60^{c-src}) (120, 121) sans inhiber l'activité d'autres kinases (ex.: récepteur à l'EGF) (122). Étant très apparenté au PP1, le PP2 s'est avéré être aussi efficace en terme de puissance. Même si le rôle exact de Src dans les effets trophiques de l'Ang II reste à être précisé, l'utilisation du PP2 permet de connaître son implication potentielle dans l'augmentation de la synthèse protéique induite par l'Ang II (121).

1.4.1.3 Les MAP kinases

Les MAP kinases (MAPKs) sont une famille de sérine/thréonine protéine kinases impliquées dans la croissance, la différenciation et la transformation cellulaires (123), ainsi que dans la synthèse protéique des CMLV (81), selon le stimulus et le type cellulaire. D'après la similarité de leurs séquences et leurs différents mécanismes d'activation, cette famille est divisée en trois sous-familles représentant les MAPKs les mieux caractérisées; il s'agit des "extracellular signal-regulated protein kinases" (ERKs), des "Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases" (JNK/SAPK) et de la p38^{MAPK} (124, 125).

Nous allons donc amorcer l'explication de la cascade menant à l'activation de la voie ERK-1/2, la voie la plus connue et la plus étudiée des MAPKs. Certaines évidences suggèrent que Src serait à l'origine de l'activation de cette voie (126, 127). Il a été démontré que la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ stimule (via Src) la phosphorylation en tyrosine, médiée par les RCPG_q (126), de la protéine adaptatrice Shc dans les CMLV (128-130). Ceci provoque la liaison de Shc avec le facteur Grb-2 via son domaine d'homologie Src SH2 (128). Par la suite, Grb-2 s'associe au facteur échangeur de nucléotide guanylique, Sos, via ses domaines SH3 (131). Le facteur Sos stimule la libération de guanosine diphosphate (GDP) et son échange par le guanosine triphosphate (GTP) pour la liaison sur Ras (p21Ras), une petite protéine G (132). Ensuite, la forme active de Ras (p21Ras-GTP) recrute une sérine kinase nommée Raf-1 à la membrane plasmique, et l'active par une phosphorylation en sérine et thréonine (133). Il a déjà été montré que Raf-1, une MAP kinase kinase

kinase, est activée par l'Ang II (134, 135). Par la suite, la Raf activée provoque la phosphorylation en sérine et l'activation de MEK-1/2, une MAP kinase kinase activée par l'Ang II (134, 135). La MEK-1/2 est une kinase à double spécificité qui phosphoryle ERK-1 et ERK-2 (MAP kinases) sur leurs résidus thréonine et tyrosine (136). Ces dernières seront décrites à la section 1.4.1.3.2.

1.4.1.3.1 *Les voies p38^{MAPK} et JNK/SAPK*

Les deux autres familles de MAPKs les mieux caractérisées, soit la p38^{MAPK} et les JNK/SAPKs (124, 125), sont activées de façon importante par des stress cellulaires ainsi que par des agonistes jouant un rôle important dans l'hypertension, comme l'Ang II. Comme pour ERK-1/2, la p38 et les JNK/SAPKs requièrent une phosphorylation en tyrosine et thréonine pour leur activation (137). Certaines cytokines proinflammatoires et stress cellulaires communs provoquent l'activation de p38 et JNK/SAPKs tels que la lumière UV, les chocs osmotique et thermique, l'étirement cellulaire et les forces de cisaillement (125, 138, 139). Cependant, il existe des différences dans les mécanismes d'activation de ces kinases. Par exemple, une ischémie rénale seule est insuffisante pour activer les SAPKs qui sont activées par la reperfusion d'un rein ischémique (140, 141). Par ailleurs, la p38 est activée lors d'une phase d'ischémie (rénale et cardiaque), mais son activité diminue lors de la reperfusion (140, 142).

Bien que la p38 et les JNK/SAPKs ne semblent pas être impliquées dans la transmission des signaux mitogènes, ces voies pourraient permettre une meilleure compréhension de la pathologie des parois vasculaires, étant donné qu'elles transmettent des signaux inhibiteurs de la croissance ou apoptotiques. Elles pourraient être en partie responsables de l'induction du phénotype hypertrophique dans différents types cellulaires (143). Toutefois, étant donné que ces voies ne sont pas être impliquées dans la synthèse protéique, nous ne poursuivrons pas leur discussion.

1.4.1.3.2 *Les ERKs et mécanismes traductionnels*

Les ERKs sont les MAPKs les plus étudiées et les mieux caractérisées. Ces kinases font partie de la superfamille de sérine/thréonine protéine kinases

omniprésentes, représentées par deux isoformes: ERK-1 (p44^{mapk}) et ERK-2 (p42^{mapk}). Certains chercheurs ont démontré que les ERK-1/2 peuvent être rapidement activées, via la cascade d'activation décrite précédemment (144), suite à une stimulation des récepteurs membranaires (ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque) ou par les RCPG (144-146) incluant les récepteurs à l'Ang II (135, 147, 148). Il est connu que l'Ang II stimule puissamment l'activité enzymatique de ERK-1/2 dans les CMLV et autres cellules cibles (80, 149).

L'activation des MAPKs semble être une étape importante dans la transmission intracellulaire des signaux de croissance se rendant jusqu'au noyau. Des études *in vitro* ont démontré que la voie ERK-1/2 des MAPKs est directement liée à la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV (81, 148). La voie ERK-1/2 aurait également un rôle à jouer dans la croissance, la différenciation ainsi que la division des CMLV (123, 150, 151). Cependant, les mécanismes d'activation aboutissant à ces effets cellulaires ne sont pas encore bien compris. On sait toutefois que les ERKs phosphorylent plusieurs protéines cellulaires telles que la kinase qui phosphoryle la protéine ribosomale S6, p90^{rsk} (152) ainsi que le facteur transcriptionnel p62^{tcf} (153, 154).

Certaines controverses existent concernant le rôle de la PKC dans l'activation de la voie ERK-1/2. Des études antérieures ont démontré que la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV n'est pas dépendante des PKC, mais serait plutôt reliée à la mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$ (155); la stimulation de la PKC par l'Ang II ne serait donc pas impliquée dans le processus d'activation des MAPKs (156). Cependant, des études *in vitro* plus récentes suggèrent que l'activation de ERK-1/2 induite par l'Ang II dans les CMLV impliquerait un isozyme atypique des PKC, soit la PKC- ζ (157). Cette forme atypique de PKC serait également impliquée dans la traduction (158-160). Des études supplémentaires devront être effectuées à ce sujet.

Étant donné que l'activité MAPK est transitoire en réponse à l'Ang II, il est important de mentionner le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la fin du signal intracellulaire. L'activité MAPK serait principalement régulée par l'activation d'une phosphatase hautement spécifique pour les MAPKs nommée "MAP kinase

phosphatase-1" (MKP-1) (161). Comme pour la MEK, la MKP-1 possède une spécificité double; cette dernière déphosphoryle MAPK sur les résidus thréonine et tyrosine, la rendant inactive (161). Une étude effectuée sur des CMLV a montré que l'inhibition de MKP-1 provoque une activation soutenue de MAPK en réponse à l'Ang II, suggérant qu'il s'agit de l'enzyme principalement responsable de la fin du signal MAPK (162).

De plus, la voie ERK-1/2 peut être bloquée au niveau de son activateur immédiat, la MEK-1/2, par le composé synthétique PD98059. Cet inhibiteur spécifique empêche la double phosphorylation sur les résidus thréonine et tyrosine de ERK-1/2, diminuant ainsi son activité (81, 163-165). Ces études ont permis de constater que l'activation de cette voie est nécessaire à l'action stimulante de l'Ang II sur la synthèse protéique dans les CMLV (81). Par ailleurs, les résultats d'une autre étude ont révélé qu'il est possible de bloquer l'activation de ERK-1/2 induite par l'Ang II avec le PP1, un inhibiteur spécifique de Src (166).

Les voies MAPKs, plus précisément ERK-1/2 et p38^{MAPK}, semblent converger vers une kinase commune nommée "MAP kinase interacting kinase-1" (MNK-1) (167, 168) (figure 1.5). En effet, certaines études *in vivo* ont rapporté que la MNK-1 serait une kinase importante dans la phosphorylation et l'activation du facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E) (169, 170), qui lui joue un rôle clé dans le mécanisme et la régulation de la traduction de l'ARNm en protéines dans les cellules de mammifères (171, 172). Mentionnons que le facteur EIF-4E est une phosphoprotéine, dont la phosphorylation est augmentée par l'insuline, les mitogènes et autres agents qui stimulent la traduction (173, 174). Il a été démontré que la phosphorylation de eIF-4E rehausse son affinité pour la coiffe 5' de l'ARNm (175) et facilite son incorporation dans les complexes impliquant eIF-4G et eIF-4A (171, 172). Puisque la traduction est l'étape limitante pour la synthèse protéique dans les cellules d'eucaryotes (176), un traitement à l'Ang II provoque la phosphorylation du facteur eIF4E, ce qui facilite la traduction de l'ARNm (177).

Un autre niveau de régulation du facteur eIF4E s'effectue par son interaction avec une famille de protéines régulatrices/inhibitrices de la traduction; il s'agit des

protéines de liaison “eIF4E-binding proteins” (4EBPs). Ces protéines inhibent la traduction coiffe-dépendante *in vitro* et *in vivo* (178). Le complexe formé par la liaison 4EBPs/eIF4E ne change pas l’affinité de eIF4E pour la coiffe (178), mais empêche plutôt l’association entre eIF4G et eIF4E. En d’autres mots, le complexe 4EBPs/eIF4E empêche la formation d’un complexe eIF4F fonctionnel (179), entravant ainsi le démarrage de la traduction (178). Une étape limitante de l’activité des 4EBPs est leur état de phosphorylation, qui régule leur affinité pour le facteur eIF4E (178, 180). Différents stimuli extracellulaires (hormones et facteurs de croissance) induisent la phosphorylation de 4EBP-1 (la 4EBP la mieux caractérisée) et ainsi diminuent sa capacité d’interagir avec le facteur eIF4E (181-184). Tel est le cas pour l’Ang II qui, lorsque lié au récepteur AT₁, stimule la phosphorylation de 4EBP-1 dans les CMLV (177), entraînant sa dissociation du facteur eIF4E. Il y a alors formation d’un complexe eIF4F fonctionnel qui permet le démarrage de la traduction. Contrairement à ces résultats, des études *in vivo* ont montré que la voie ERK-1/2 des MAPKs ne serait pas impliquée dans la phosphorylation de 4EBP-1 par l’Ang II (181, 185, 186).

1.4.1.4 Voie de la PI₃-kinase

La liaison de l’Ang II au récepteur AT₁ stimule, en plus des voies déjà mentionnées, l’activation d’une phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃-K). Toutefois, le mécanisme exact par lequel le récepteur AT₁ active la PI₃-K n’a pas encore été élucidé. La PI₃-K fait partie d’une famille de kinases lipidiques impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la résistance à l’apoptose, la mobilité, la prolifération et la différenciation cellulaires (187). Par ailleurs, certaines études ont montré que l’activation de la PI₃-K peut être bloquée par deux inhibiteurs spécifiques: la wortmannin (188) et le LY294002 (189, 190).

Certains chercheurs font allusion à une possibilité de chevauchement entre la voie PI₃-K et la voie ERK-1/2 des MAPKs. Il serait possible que l’activation de Src se fasse soit directement via le récepteur AT₁, soit via l’activation de la PI₃-K (191). Selon certains chercheurs, l’activation de la PI₃-K se ferait en amont de l’activation de Ras, suggérant un rôle de cette kinase dans l’activation ERK-1/2 (191). D’autres

ont suggéré que la stimulation par les RCPG de la voie ERK-1/2 dépendante de Ras impliquerait une régulation intermédiaire non seulement par une tyrosine kinase, mais aussi par la PI₃-K (191, 192). Il est facile de constater l'existence de plusieurs possibilités d'activation de ces voies de signalisation.

L'effecteur en aval de la PI₃-K est une sérine/thréonine kinase nommée Akt, le produit du proto-oncogène c-akt, et la protéine kinase B (PKB) (193). Mentionnons que certaines études ont démontré que l'Akt serait impliquée dans la traduction (158-160). L'Akt active par la suite la kinase FRAP/mTOR (FKBP-rapamycin associated protein/mammalian target of rapamycin) (194) qui s'auto-phosphoryle. Cette grosse protéine (289 kDa) fait partie de la famille de kinases PIK (phosphatidylinositol kinase-related kinases) (195-197). Les membres de cette famille ont été initialement identifiés par leur homologie aux kinases lipidiques telles que la PI₃-K, toutefois, certains membres de cette famille semblent fonctionner comme des protéines kinases (195-197). Le rôle de la protéine kinase FRAP/mTOR a été mis en évidence par différents groupes, montrant que celle-ci phosphoryle et active la P70 S6 kinase (70-kD S6 kinase ou P70^{S6K}). Ils ont démontré que l'activation de la P70^{S6K} peut être bloquée par un traitement à la rapamycine, un immunosuppresseur, qui inhibe sélectivement l'autophosphorylation de FRAP/mTOR (185, 187, 194, 198-200) dans les CMLV en culture (79, 80, 201). L'Ang II stimule, via la P70^{S6K}, la phosphorylation rapide de la protéine ribosomale S6, une composante de la sous-unité ribosomale 40S d'importance majeure dans les CMLV (202, 203). Des études plus approfondies à ce sujet ont montré que la phosphorylation de la protéine S6 régularise la traduction des ARNm riches en pyrimidine (203), résultant en une augmentation du taux de synthèse protéique ainsi qu'en une augmentation sélective de ces ARNm dans l'étape de la traduction (203).

La cascade PI₃-K/FRAP/mTOR peut également influencer la synthèse protéique par d'autres mécanismes. En effet, la phosphorylation de 4EBP-1 serait non seulement sensible à la rapamycine (186), mais elle serait induite par les mêmes effecteurs que la P70^{S6K}, et sa phosphorylation aurait lieu avec des cinétiques semblables en réponse à un traitement aux agents mitogènes. Certaines composantes de cette cascade d'événements ont récemment été identifiées; la 4EBP-1 serait située

en aval de la PI₃-K et de l'Akt (193) (figure 1.5). De plus, la phosphorylation de 4EBP-1 serait dépendante de FRAP/mTOR (158, 200, 204, 205). Ainsi, la rapamycine diminuerait la phosphorylation de 4EBP, expliquant une partie de son effet inhibiteur sur la synthèse protéique. La protéine kinase FRAP/mTOR serait donc un régulateur (en amont) commun à la P70^{S6K} et aux 4EBPs (206, 207). Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée par des expériences démontrant qu'une forme de P70^{S6K} résistante à la rapamycine était incapable de conférer une résistance équivalente à la 4EBP-1 (204, 205). Ainsi, par les différents mécanismes d'activation des voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique induite par l'Ang II, il est possible de conclure que l'activation de la P70^{S6K} serait contrôlée par une voie différente de celle de ERK-1/2 (80, 208, 209).

1.4.2 Récepteurs AT₂

Contrairement aux récepteurs AT₁, les connaissances sur la signalisation intracellulaire et les effets physiologiques du récepteur AT₂ sont plus controversés. D'une part, les récepteurs AT₂ ne sont pas exprimés en abondance dans plusieurs tissus adultes (210). Aussi, leur disparition dans la plupart des cultures cellulaires (et surtout dans les cultures de CMLV) rend difficile l'étude *in vitro* de la signalisation de ce sous-type de récepteur.

Le récepteur AT₂ serait possiblement lié aux voies de signalisation intracellulaires impliquant la protéine G_i (211-213). Par ailleurs, il a été démontré que l'activation du récepteur AT₂ provoque une diminution rapide et transitoire de la phosphorylation en tyrosine de plusieurs protéines (214). Comme nous l'avons mentionné, cette phosphorylation joue un rôle crucial dans le contrôle de la croissance cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'action du récepteur AT₂ serait médiée par une protéine tyrosine phosphatase (PTPase). Contrairement aux résultats obtenus par Kambayashi et al. montrant que la liaison de l'Ang II au récepteur AT₂ entraîne une inhibition des PTPases (39), il est plus probable que le récepteur AT₂ entraîne une activation de ces dernières. En effet, il a été démontré que l'Ang II active une tyrosine phosphatase soluble nommée protéine SHP-1 (ou SH-PTP-1) impliquée dans l'arrêt du signal des récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance (214).

De plus, la SHP-1 entraînerait l'inhibition de ERK-1/2 des MAPKs (215, 216), provoquant ainsi l'inactivation de protéine kinases et/ou d'effecteurs essentiels pour la synthèse protéique et la synthèse d'ADN. Cette inhibition des MAP kinases pourrait conduire à l'inactivation du facteur anti-apoptotique Bcl-2, provoquant la mort cellulaire programmée ou apoptose (217). En d'autres termes, le récepteur AT₂ médie des effets inhibiteurs de la croissance, en partie via l'activation des PTPases, résultant en une inactivation des MAPKs ERK-1/2 (50, 213, 216-220) dans les cellules neuronales de rat en culture (215). Une diminution de l'activité ERK a également été observée dans le cœur de souris transgéniques surexprimant le récepteur AT₂ (221), suggérant que l'inactivation de ERK par le récepteur AT₂ jouerait un rôle *in vivo*.

D'autre part, la liaison de l'Ang II au récepteur AT₂ pourrait également induire la synthèse de la protéine phosphatase MKP-1. Comme nous l'avons déjà mentionné, la MKP-1 est une enzyme capable d'inactiver certains membres de la famille des MAP kinases. Mentionnons qu'en plus de ces effets, l'activation du récepteur AT₂ peut provoquer la libération d'acide arachidonique dans certains types cellulaires (probablement via la PLA₂) (222).

En résumé, même si les récepteurs AT₁ et AT₂ font partie de la grande famille des RCPG, des évidences révèlent que leurs rôles sont mutuellement antagonistes. Par exemple, le récepteur AT₁ stimule la croissance cellulaire alors que le récepteur AT₂ inhibe cette réponse. Les effets inhibiteurs de la croissance du récepteur AT₂ sont uniques, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un RCPG qui neutralise l'effet de croissance d'autres RCPG ainsi que d'autres classes de récepteurs des facteurs de croissance (223). Chez l'homme, l'importance physiologique des récepteurs AT₂ est toutefois mise en doute. La disparition des récepteurs AT₂ dans la plupart des cultures cellulaires rend difficile l'étude *in vitro* des rôles de ce sous-type de récepteur (224).

1.5 LES EFFETS CELLULAIRES ET ACTIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'ANG II

1.5.1 Récepteurs AT₁

L'Ang II est une hormone qui engendre une grande diversité d'effets cellulaires (15, 225). Parmi ceux-ci, les effets vasoactifs de l'Ang II jouent un rôle très important dans le système cardiovasculaire, notamment par le maintien du tonus vasculaire (226). Aussi, il est bien connu que la majorité des effets de l'Ang II dans les tissus cardiovasculaires sont médiés par les récepteur AT₁.

1.5.1.1 Hypertrophie vasculaire

Plusieurs études *in vitro* ont démontré que l'Ang II stimule, via les récepteurs AT₁, la croissance des CMLV (155, 227, 228), les myocytes cardiaques et autres types cellulaires (15, 225, 229, 230). Il a été démontré qu'à plus long terme, la stimulation de la croissance cellulaire par l'Ang II est suivie d'une réponse hypertrophique ou hyperplasique selon le type cellulaire. De façon générale, une réponse hypertrophique, caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, a été observée dans les CMLV en culture (80, 227, 231), alors qu'une réponse hyperplasique, qui se caractérise par une augmentation du nombre cellulaire, a été observée dans les fibroblastes cardiaques (229, 230).

Par contre, l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaires par l'Ang II provoque aussi une augmentation de l'expression de proto-oncogènes (gènes qui stimulent la prolifération cellulaire) ainsi que la production de facteurs de croissance (PDGF, bFGF) ayant des effets autocrines (232). Malgré l'activation des proto-oncogènes et des agents mitogènes, des évidences suggèrent que l'Ang II induit une réponse hypertrophique plutôt qu'hyperplasique dans les CMLV quiescentes privées de sérum (233). Des études antérieures ont montré la même réponse *in vivo*, soit le développement à plus long terme d'une hypertrophie vasculaire et cardiaque chez les rats traités à l'Ang II (234). Il a également été démontré qu'une perfusion prolongée d'Ang II provoque la même réponse hypertrophique dans les petites artères de rats (235). De plus, il est important de souligner qu'une administration i.v.

prolongée d'Ang II a provoqué une hypertrophie vasculaire indépendamment de ses effets sur la pression artérielle (231, 236, 237).

Les bases moléculaires de l'action hypertrophique de l'Ang II restent cependant à être précisées. Toutefois, cette réponse pourrait se manifester par des changements au niveau de la transcription des gènes, ainsi qu'au niveau de la vitesse de traduction des ARNm. Il serait également possible que la détermination moléculaire de l'hypertrophie cellulaire versus l'hyperplasie se fasse au niveau de la machinerie moléculaire contrôlant la progression du cycle cellulaire (238). Une équipe a tenté d'expliquer ce phénomène en utilisant le p27^{Kip1}, un inhibiteur des Cdk (kinases dépendantes des cyclines qui activent le cycle cellulaire). Les niveaux élevés de p27^{Kip1} dans les cellules quiescentes traitées à l'Ang II résultent en une hypertrophie, alors que des niveaux faibles de p27^{Kip1} provoquent une hyperplasie (comme avec la présence d'autres facteurs de croissance) (233). Il existerait donc un lien direct entre le niveau d'expression de p27^{Kip1} et l'hypertrophie des CMLV.

Certains groupes se sont penchés sur le rôle des MAPKs dans la prolifération de différents types cellulaires (239, 240), démontrant que les ERKs joueraient un rôle important dans la régulation de cette réponse (241, 242) ainsi que dans la signalisation des agents mitogènes comme l'Ang II (243). D'autre part, le mécanisme par lequel la rapamycine, l'immunosuppresseur qui bloque sélectivement la P70^{S6K}, jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire n'est pas bien connu (244). Toutefois, il serait également possible que la rapamycine puisse cibler des effecteurs situés en amont de la P70^{S6K}, qui eux, joueraient un rôle plus important dans la régulation de la prolifération cellulaire (202).

Une réponse commune aux cellules stimulées par les facteurs mitogéniques et hypertrophiques est l'activation de la synthèse protéique. Plusieurs études ont démontré que l'hypertrophie cellulaire induite par l'Ang II résulte d'une augmentation de la synthèse protéique dans les CMLV de rats normaux (155, 227, 245, 246). De plus, certaines évidences *in vitro* suggèrent que l'activation de certaines voies de signalisation de l'Ang II stimule le taux global de synthèse protéique dans les CMLV. En effet, au moins deux voies de signalisation indépendantes seraient

directement impliquées dans l'induction de la synthèse protéique par l'Ang II, la première étant la voie ERK1/2 des MAPKs (81, 147, 148). La voie ERK jouerait un rôle important dans la régulation de la synthèse protéique globale dans les CMLV, puisque l'inhibition de cette voie par le PD98059, un inhibiteur sélectif de MEK-1/2, a été montrée par l'équipe de Servant et al. (81). De même, l'activation de la P70^{S6K} jouerait un rôle important dans la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les CMLV aortiques de rats, tel que démontré par des études impliquant la rapamycine, un inhibiteur sélectif de la P70^{S6K}, produisant une déphosphorylation de la P70^{S6K} en conditions basales, et empêchant la phosphorylation de la P70^{S6K} induite par l'Ang II (79, 80). La réponse inhibitrice que produit la rapamycine sur la synthèse protéique précède des changements du taux de prolifération cellulaire, tel que montré dans les cellules lymphoïdes. L'inhibition spécifique de la synthèse protéique ribosomale pourrait expliquer l'effet anti-prolifératif de la rapamycine sur les cellules quiescentes activées sous l'action des mitogènes (247).

Dans les CMLV, l'induction de la synthèse protéique par l'Ang II est associée à une augmentation sélective du contenu cellulaire en protéines contractiles et en protéines de la matrice extracellulaire (248). Cette hausse de production de protéines incluant l' α -actine, la thrombospondine et le collagène s'accompagne d'une augmentation concomitante de l'expression des ARNm, suggérant que des changements au niveau transcriptionnel contribuent de façon importante à la stimulation globale de la synthèse protéique par l'Ang II. En outre, des études récentes montrent que l'Ang II exerce des effets au niveau de la phosphorylation des composantes de la machinerie traductionnelle de la cellule. L'ensemble de ces observations indique que suite à l'activation du récepteur AT₁, la stimulation de la synthèse protéique pourrait résulter de changements tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel (248-250). La synthèse protéique est associée à une augmentation de l'expression d'ARNm pour les gènes impliqués dans la croissance comme c-fos et c-myc (251). L'ensemble de ces études réalisées sur des modèles cellulaires a apporté plusieurs nouvelles connaissances au sujet des mécanismes moléculaires probables menant aux effets trophiques de l'Ang II; toutefois, à la

lumière de nos connaissances, aucune étude n'a été réalisée dans le but d'examiner la contribution des différentes voies de signalisation liées à ce processus *in vivo*.

1.5.1.2 Hypertrophie cardiaque

Le SRA existe non seulement dans la circulation sanguine mais aussi dans les tissus cardiaques (252, 253), toutes les composantes du SRA ayant été identifiées dans le cœur (253, 254), tant au niveau des ARNm qu'au niveau des protéines (255, 256). Des évidences ont démontré que l'Ang II joue un rôle très important dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. En effet, l'hypertrophie cardiaque est induite par une surcharge hémodynamique (257, 258) ainsi que par des facteurs humoraux tels que l'Ang II (259, 260). L'hypertrophie cardiaque serait due à une hypertrophie cellulaire, une induction de la polyploïdie (synthèse d'ADN active sans mitose cellulaire) et une augmentation des dépôts de la matrice extracellulaire.

Cependant, les mécanismes qui gouvernent le développement de l'hypertrophie cardiaque ne sont pas bien connus, malgré le fait que ce sont les récepteurs AT₁ qui médient la réponse hypertrophique de l'Ang II. Une augmentation de la synthèse des récepteurs AT₁ au niveau du cœur suggère un rôle de ce récepteur dans la génèse ou le maintien de la croissance exagérée du tissu cardiaque (261).

L'importance de l'Ang II a été démontré par de nombreuses études. *In vitro*, l'Ang II provoque une hypertrophie cardiaque dans les cardiomyocytes néonataux de rats (79, 112, 259, 262, 263). De plus, cette même réponse est observée *in vivo* lorsque l'Ang II est administré à des doses non-pressives (231, 264). Certains chercheurs ont observé qu'une hypertrophie du ventricule gauche (induite par une surcharge hémodynamique) chez le rat a pour conséquence d'activer le SRA cardiaque en augmentant les niveaux d'angiotensinogène, d'ECA et des ARNm du récepteur AT₁ (256, 265, 266). Ces études suggèrent que le SRA local semble jouer un rôle important dans l'hypertrophie cardiaque par un mécanisme autocrine ou paracrine.

Certaines études ont montré que les IECA (267, 268) ainsi que les antagonistes des récepteurs AT₁ (269, 270) sont très efficaces pour induire une régression de l'hypertrophie cardiaque chez les animaux. Chez des rats SHR traités avec un IECA

ou un antagoniste AT₁, ou encore chez les rats ayant subi une surcharge volémique, un ralentissement de la croissance rapide du cœur chez le porc nouveau-né ou l'inhibition de l'hypertrophie du myocarde est observée (234).

Le développement d'une hypertrophie cardiaque chez les rats traités à l'Ang II a également été décelé *in vivo* (234), où certaines études ont montré que les IECA diminuent l'hypertrophie cardiaque induite soit par l'hypertension (271), un infarctus du myocarde (272) ou une coarctation aortique (273), suggérant ainsi un rôle crucial de l'Ang II dans la pathophysiologie de l'hypertrophie cardiaque. Chez l'homme, les IECA sont parmi les agents antihypertenseurs les plus puissants pour réduire les effets d'une hypertrophie cardiaque (274).

In vivo, l'Ang II active la synthèse protéique sans l'induction de proto-oncogène dans le cœur de rat adulte, alors qu'*in vitro*, l'expression des proto-oncogènes est essentielle pour la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les cardiomyocytes de rats néonataux (260). Il nous semblait donc important d'étudier la contribution des différentes voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque induite par l'Ang II dans des conditions *in vivo*, afin de se rapprocher des conditions physiopathologiques.

1.5.1.3. Vasoconstriction

L'Ang II provoque également une vasoconstriction des artères, en favorisant la contraction des CMLV (225). La vasoconstriction induite par l'Ang II diffère d'intensité selon le lit vasculaire; cette réponse est plus puissante au niveau des reins et du mésentère (artérioles périphériques du territoire splanchnique). Le mécanisme intracellulaire aboutissant à cette réponse n'est pas certain, cependant, il est connu que le phénomène de la contraction est activé par les voies classiques de l'Ang II. En effet, la stimulation des récepteurs AT₁ provoque la contraction du muscle lisse en activant différents effecteurs comme les PLC, PLA₂, PLD ainsi que les canaux calciques voltage-dépendants (275).

D'autres études ont montré que les tyrosine kinases joueraient également un rôle dans le processus dynamique de la contraction du muscle lisse (276, 277). Les tyrosine kinases participeraient donc à la régulation des voies de signalisation

associées à la contraction et à la croissance médiées par les récepteurs AT_1 (278). De plus, il semble que la voie ERK des MAPKs, également associée à la croissance cellulaire, pourrait jouer un rôle important dans la contraction des CMLV humaines (279), même si les résultats d'une autre étude montre que l'activation de MEK (et donc de ERK) et la contraction sont deux phénomènes dissociés (165).

Puisque nous modifierons l'activité de certaines voies de signalisation *in vivo*, il faudra tenir compte des changements de la pression artérielle, étant donné que des changements importants de la pression artérielle en soi pourraient influencer le taux de synthèse protéique vasculaire (280, 281).

1.5.1.3. Aldostérone

Bien que cette section ne soit pas directement reliée au travail présenté, ils nous apparaissait important de mentionner que l'Ang II stimule la sécrétion d'aldostérone. En effet, la régulation de la sécrétion d'aldostérone, une hormone aux propriétés minéralocorticoïdes, est un processus complexe qui pourrait impliquer plusieurs mécanismes, les plus puissants étant l'activation du SRA et les concentrations d'ions potassiques (K^+).

Le mécanisme par lequel l'activation du SRA régularise la sécrétion d'aldostérone s'explique comme suit. Une diminution du débit sanguin rénal résultant d'une diminution du volume sanguin causée par une déshydratation ou une hémorragie stimule les cellules juxtaglomérulaires des reins à sécréter la rénine, à partir de laquelle est formée l'Ang II (section 1.2.1). Par la suite, l'activation du SRA provoque la stimulation de la corticosurrénale (zone glomérulaire) qui produit une grande quantité d'aldostérone. À son tour, l'aldostérone agit sur les reins où il facilite la réabsorption de Na^+ , tout en éliminant le K^+ (6). Cette réabsorption entraîne donc une augmentation du volume de fluide extracellulaire et par la suite, provoque une augmentation soutenue et prolongée de la pression artérielle, ramenant le SRA à son niveau normal d'activité (2, 6). Il s'agit de mécanismes régulateurs essentiels pour l'homéostasie du système hydro-électrolytique.

1.5.2. Récepteurs AT₂

Les récepteurs AT₂ jouent un rôle important dans le processus physiologique normal ainsi que pathologique de la croissance des CMLV. Alors que la synthèse du récepteur AT₂ est réprimée chez l'adulte (210), ce récepteur est ré-exprimé en réponse à des lésions vasculaires ou processus associés à un remodelage important (50) tels que la cicatrisation cutanée, la ré-endothélialisation de la paroi vasculaire ou au cours de l'hypertrophie ventriculaire gauche après sténose de l'aorte thoracique (224). Certaines évidences suggèrent que le récepteur AT₂ jouerait un rôle important dans la formation néointimale suivant une lésion vasculaire *in vivo* (282), et qu'une augmentation de son expression serait liée à certaines conditions pathologiques cardiovasculaires comme le diabète (52), l'infarctus du myocarde (283), l'ischémie cardiaque (53) et l'hypertension (54). Alors que ces études suggèrent une action trophique du récepteur AT₂ (284), d'autres études ont montré un rôle anti-trophique ou anti-hypertrophique de ce récepteur dans les CMLV (50) et autres types cellulaires (51, 285, 286). L'activation des récepteurs AT₂ pourrait servir de frein dans certains processus de croissance cellulaire rapide, contribuant ainsi à la régulation de l'homéostasie tissulaire.

Aussi, des études *in vitro* ont démontré que l'effet anti-prolifératif de l'Ang II serait médié par les récepteurs AT₂ (51, 218, 220) des CMLV (50). Cet effet anti-prolifératif des récepteurs AT₂ s'exercerait en partie par l'induction de l'apoptose des CMLV (51, 220, 287) et autres types cellulaires (213, 217, 220, 288), tel que montré par des études *in vitro* et *in vivo*. L'apoptose est un processus qui joue un rôle critique dans le développement normal vasculaire ainsi que dans certaines conditions pathologiques (289) telles que l'athérosclérose (290, 291), l'hypertension (292) et la resténose après angioplastie (293), toutefois, son implication dans la genèse de ces maladies reste à être précisée. L'apoptose contribuerait également au remodelage vasculaire ayant lieu peu après la naissance (294). Alors que certains chercheurs ont montré que le récepteur AT₂ est un facteur pro-apoptotique dans les CMLV (220), d'autres suggèrent que ce récepteur est incapable d'induire l'apoptose dans ce même type cellulaire en raison de la disparition de leur expression dans les cellules ayant subi plusieurs passages lors de la culture cellulaire (295). Malgré cette controverse,

une étude *in vivo* plus récente propose que la stimulation des deux sous-types de récepteurs à l'Ang II serait associée à une augmentation de l'apoptose dans les CML aortiques de rats (296). Par ailleurs, d'autres suggèrent que l'Ang II pourrait moduler le remodelage vasculaire par les effets compensatoires des récepteurs AT₁ et AT₂ lors de l'apoptose; le récepteur AT₁ étant un facteur anti-apoptotique, et le récepteur AT₂ étant pro-apoptotique dans les CMLV (295).

L'ensemble de ces résultats démontre que les récepteurs AT₂ auraient une action antagoniste sur les récepteurs AT₁, d'où l'opposition de leurs effets sur la structure vasculaire. Toutefois, il a été suggéré récemment que les effets trophiques et prolifératifs de l'Ang II (au niveau du mésentère) seraient médiés par les deux sous-types de récepteurs à l'Ang II (297).

De plus, il semble que le récepteur AT₂ joue un rôle important au niveau de la pression artérielle. Une surexpression de ce récepteur inhiberait les effets presseurs de l'Ang II chez le rat (298, 299) et la souris (221). Ces résultats suggèrent que les récepteurs AT₂ provoquent une vasodilatation; toutefois, les mécanismes de ce phénomène ne sont pas bien compris. Il serait possible que l'expression transitoire et régulée des récepteurs AT₂ pourrait exercer un effet à long terme sur la pression artérielle possiblement par leur influence sur la structure vasculaire (223) (Tableau 1.2).

Récepteurs AT ₁	Récepteurs AT ₂
<ul style="list-style-type: none"> - Vasoconstriction - Stimulation de la synthèse et de la libération d'aldostérone - Réabsorption du sodium par le tubule rénal - Croissance cardiaque - Prolifération des CMLV - Augmentation de l'activité noradrénergique périphérique - Augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (SNS) - Stimulation de la vasopressine - Réduction du débit sanguin rénal - Inhibition de la rénine rénale 	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation de l'apoptose - Effet anti-prolifératif - Différentiation et développement embryonnaires - Vasodilatation

Tableau 1.2: Effets des récepteurs AT₁ et AT₂ de l'Ang II.

1.6 LES IMPLICATIONS DE L'ANG II DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES

Malgré son rôle bénéfique dans l'homéostasie circulatoire en tant que régulateur de la pression artérielle (300-302), l'activation du SRA peut aussi être néfaste, contribuant au développement de certaines pathologies cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale et l'hypertension (25, 303). L'effecteur principal du SRA, l'Ang II, a des effets bien caractérisés au niveau du système nerveux central et périphérique (SNC, SNP), du cœur et des vaisseaux sanguins ainsi qu'au niveau du rein et de la glande surrénale, comme l'ont démontré plusieurs études expérimentales et cliniques.

1.6.1 Hypertension

L'hypertension artérielle est une des maladies cardiovasculaires les plus répandues, causée, entre autres, par l'interaction de facteurs environnementaux et génétiques. Cette condition pathologique se caractérise par une augmentation soutenue de la pression artérielle, et par conséquent, peut causer des lésions importantes au niveau du cœur, des reins et du cerveau. L'hypertension artérielle est l'une des principales causes de maladies cardiaques, d'accidents cérébrovasculaires (ACV) et d'insuffisance rénale (1).

Une augmentation accrue de la pression artérielle, telle qu'observée lors de l'hypertension artérielle, peut résulter d'un tonus vasoconstricteur élevé, d'une réduction de la contribution de vasodilatateurs endogènes ou encore d'une combinaison de ces facteurs dans les artères de résistance (10). Lors de l'hypertension, l'augmentation de la résistance périphérique est associée à des changements fonctionnels et structuraux (remodelage) au niveau des artères, en réponse aux changements neurohumoraux et hémodynamiques. En effet, les artères s'adaptent à une augmentation de la tension de leur paroi en modifiant leur géométrie.

Ainsi, un premier type de remodelage, représentant un mécanisme adaptatif nécessaire pour compenser la tension augmentée de la paroi induite par une pression artérielle élevée (10) est le remodelage eutrophique, caractérisé par une augmentation du rapport média/lumière des artères de résistance sans pour autant que la quantité de

tissu, ou l'aire de section médiale augmente (304). Ce type de remodelage est présent lors de la forme la plus commune d'hypertension, soit l'hypertension essentielle ou primaire.

Un second type de remodelage vasculaire est caractérisé par une augmentation du rapport média/lumière, mais ce phénomène serait causé par une augmentation de l'aire de section médiale (CSA) due à une hyperplasie (305) ou une hypertrophie (306). On parle alors d'un remodelage hypertrophique vasculaire, présent lors de l'hypertension rénovasculaire (aussi appelée hypertension par ischémie rénale) (307). Il s'agit d'une forme secondaire d'hypertension qui fait intervenir le SRA, et dont la cause est identifiable (ex.: maladie rénale, hyperaldostéronisme, etc.). Chez l'homme, cette forme d'hypertension est provoquée par l'oblitération ou le rétrécissement de l'une ou des deux artères rénales en raison d'une embolie, d'une thrombose, d'une compression ou d'une lésion de la paroi artérielle. En réaction à ce phénomène, les reins sécrètent la rénine, ce qui augmente les niveaux d'Ang II dans la circulation, qui entraîne une augmentation encore plus importante de la pression artérielle et un remodelage cardiovasculaire. Étant donné que certains facteurs indépendants de la pression, comme l'Ang II, semblent contribuer au développement du remodelage hypertrophique (et non eutrophique), nous nous sommes attardés à ce type de remodelage dans cette étude en administrant de l'Ang II exogène, dans le but de mimer l'hypertension rénovasculaire.

Cependant, le remodelage vasculaire des grosses artères diffère de celui des artères de résistance en raison des différences de leur fonction principale: transporter le sang. Une augmentation du rapport média/lumière dans une grosse artère implique nécessairement une augmentation de la quantité de matériel dans la média, puisque la lumière n'est pas affectée (308). Ainsi, l'administration d'Ang II exogène pourra reproduire le remodelage aortique présent dans l'hypertension artérielle.

Lorsque l'hypertension n'est pas stabilisée, cette pathologie peut également entraîner des lésions importantes au niveau du cœur. Une pression artérielle élevée exige une plus grande dépense énergétique du cœur pour effectuer son travail de propulsion. En effet, dans ces conditions, la post-charge ventriculaire, c'est-à-dire

tout ce qui résiste à l'évacuation du sang par le ventricule, augmente. Cette surcharge de travail entraîne un épaissement du muscle cardiaque et une hypertrophie du cœur. L'hypertrophie est une réponse adaptatrice du cœur à une surcharge hémodynamique subite qui peut être amplifiée par des facteurs neurohumoraux comme l'Ang II. Il est généralement accepté que l'hypertrophie cardiaque est une des plus importantes causes de maladies cardiaques, prédisant des risques élevés d'accidents cérébro-vasculaires (ACV) ou d'arrêts cardiaques. Pour le traitement de l'hypertension, il est donc important de bien comprendre le mécanisme de l'hypertrophie cardiaque et d'établir des avenues pharmacologiques efficaces afin de renverser cette hypertrophie tout en diminuant la pression artérielle (309).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'Ang II joue un rôle important dans l'hypertension. Certains résultats *in vivo* ont montré qu'à dose modérée, l'Ang II provoque une augmentation très lente et graduelle de la pression artérielle (227, 310). Par contre, d'autres études ont montré que le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire est indépendant de l'augmentation de la pression artérielle (231, 237, 311, 312). C'est en se basant sur les résultats de ces études chroniques que nous avons établi notre modèle expérimental avec l'Ang II exogène, dans le but d'étudier les effets trophiques de l'Ang II indépendants de ceux exercés par une augmentation de la pression artérielle.

L'importance de l'Ang II dans l'hypertension artérielle a été démontré par l'efficacité des IEC et des antagonistes sélectifs non-peptidiques des récepteurs AT₁ dans le traitement pharmacologique de cette pathologie et des maladies cardiovasculaires qui lui sont associées. Parmi les antagonistes des récepteurs AT₁, il a été rapporté que le candesartan et l'irbésartan sont plus efficaces que le losartan chez les patients présentant une hypertension légère à modérée (313, 314). D'autre part, les IEC sont également utilisés pour traiter l'hypertension (315, 316) et sont reconnus pour améliorer la fonction et le remodelage cardiaque. Ces effets protecteurs des IEC seraient possiblement dus à l'inhibition du SRA et/ou à l'inhibition de la destruction des kinines (317, 318). Notons que les différences entre les effets à long terme des antagonistes AT₁ et les IEC dans les traitements contre l'hypertension et les maladies cardiovasculaires ne sont pas encore connues.

Il est important de mentionner que l'action des antagonistes des récepteurs AT₁ ne serait pas entièrement due à l'inhibition de ce sous-type de récepteurs (319); elle serait causée, en partie, par la stimulation du récepteur AT₂ (320). Toutefois, la localisation et le temps d'expression du récepteur AT₂ dans les maladies cardiovasculaires, de plus que les facteurs régulant les récepteurs AT₂ *in vivo* incluant les ligands de ces récepteurs restent à être définis. Il est maintenant connu que le récepteur AT₂ joue certains rôles dans la pathogenèse et le remodelage des maladies cardiovasculaires. D'une part, des connaissances approfondies sur le récepteur AT₂ pourraient contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour mieux traiter les maladies cardiovasculaires et l'hypertension. D'autre part, certaines études ont montré qu'une diminution plus importante de la pression artérielle et de la post-charge peut être obtenue en ajoutant un antagoniste des récepteurs AT₁ à un IEC, permettant ainsi de prévenir les effets délétères de l'Ang II produit par les voies métaboliques alternes (321-323). Chez l'homme, des études ont montré que les antagonistes des récepteurs AT₁ pouvaient être associés sans risque aux IEC dans le traitement de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque congestive, ainsi qu'en période aigüe suivant un infarctus du myocarde (324, 325).

Pour finir, l'activité du SNS semble également jouer un rôle important dans l'hypertension. Les interactions entre le SRA et le SNS s'exercent tant au niveau des centres intégrateurs de la régulation cardiovasculaire, qu'au niveau des mécanismes périphériques présynaptiques et postsynaptiques des terminaisons nerveuses sympathiques. L'ensemble des différentes actions de l'Ang II endogène facilite la transmission sympathique (326). De plus, il a été démontré que le SNS représente l'un des principaux mécanismes responsable de la libération de rénine par l'activation des récepteurs β -adrénergiques des cellules juxtaglomérulaires (327). Il semble donc que les deux systèmes se stimulent mutuellement, ce qui pourrait jouer un rôle important dans la pathogénie de plusieurs pathologies du système cardiovasculaire telles que l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque (326).

1.6.2 Athérosclérose

L'athérosclérose est un stade de l'artériosclérose, une maladie chronique des artères caractérisée par un épaissement et une rigidité de la paroi artérielle. L'athérosclérose se caractérise par l'accumulation de dépôts lipidiques (cholestérol et triglycérides) dans la tunique interne du vaisseau sanguin, formant par la suite une plaque athérosclérotique (athérome). La surface rugueuse de cette plaque provoque la libération du PDGF (facteur mitotique des plaquettes ou platelet-derived growth factor) par les plaquettes, les macrophages et les cellules endothéliales, favorisant ainsi la prolifération des CML. La prolifération des CML de la média et la migration qui s'ensuit semblent être les raisons principales pour la formation néointimale (328). La plaque athérosclérotique devient de plus en plus nocive en raison de la prolifération et de l'épaississement des fibres élastiques, de l'atrophie du tissu conjonctif, puis de la calcification; ces processus s'étendent de l'intima vers la média. Ces plaques atteignent surtout les grosses et les moyennes artères (aorte, artères coronaires et cérébrales, artères des membres) où elles provoquent une réduction accrue de la lumière artérielle, aboutissant à une obstruction complète. En réduisant l'élasticité de la paroi artérielle et en rétrécissant la lumière dans laquelle circule le sang, le phénomène de l'athérosclérose provoque une élévation de la pression artérielle pulsée (2, 12).

Certaines évidences ont montré que l'Ang II pourrait jouer un rôle important dans la formation néointimale (329, 330). Plus précisément, l'activation du SRA tissulaire serait associée au développement de l'athérosclérose (331, 332). Certaines études ont rapporté que les IECA et les antagonistes des récepteurs AT₁ bloquent la reproduction cellulaire, la migration vers l'intima et, de façon importante, l'épaississement intimal chez le rat (333-336), indiquant que l'Ang II est un médiateur important dans la formation néointimale.

1.7 Objectifs

Comme nous l'avons mentionné à la section précédente, une administration prolongée d'Ang II provoque des changements significatifs dans la structure vasculaire (337), conduisant à un remodelage hypertrophique des artères de résistance de façon indépendante à un changement de la pression artérielle (231, 237). Aussi, il est bien connu que l'Ang II stimule l'hypertrophie dans les CMLV en produisant une augmentation de la synthèse protéique (227). Cette augmentation du taux global de synthèse protéique est déclenchée par l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaires activées par la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁. Néanmoins, il existe encore peu d'informations sur la contribution de ces voies de signalisation menant à l'effet trophique vasculaire de l'Ang II dans les CMLV et les cardiomyocytes *in vivo*. De plus, une approche *in vivo* a le potentiel de dévoiler une hétérogénéité entre les différents segments du système cardiovasculaire, ce qui est difficilement réalisable sur des cellules en culture.

Cette étude comprend quatre objectifs principaux. Le premier consiste à mettre au point une méthode permettant de déterminer la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les petits et gros vaisseaux ainsi que dans le ventricule gauche *in vivo*, afin d'obtenir un indice précoce de remodelage hypertrophique. Cette méthode permettra d'évaluer le second objectif, soit la contribution des récepteurs AT₁ et des voies ERK-1/2 et P70^{S6K} dans l'hypertrophie cellulaire induite par l'Ang II dans les artères mésentériques et l'aorte *in vivo*, en utilisant divers agents pharmacologiques (irbésartan, PD98059 et rapamycine). Le troisième objectif sera de déterminer le rôle potentiel de Src dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II dans le mésentère et l'aorte, en utilisant un inhibiteur sélectif à cette famille de tyrosine kinase (PP2). Et finalement, le quatrième objectif sera de déterminer l'implication de ces voies de signalisation, ou encore le(s) effet(s) des agents inhibiteurs reliés à ces voies, au niveau du ventricule gauche du cœur.

CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Modèle expérimental:

Nous avons utilisé des rats Sprague-Dawley (normotendus) ayant un poids de 300g à 325g (Laboratoires Charles River, Qué., Canada). Afin d'effectuer nos expériences dans des conditions *in vivo*, ces rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (65 mg/kg, i.p.), nous permettant ainsi de procéder à la chirurgie impliquant l'insertion d'un cathéter de polyéthylène (un segment PE10 inséré dans un segment PE50) dans l'artère et la veine fémorales. Chez certains rats, nous avons implanté une pompe osmotique Alzet® (modèle 1003D, amorcées la veille dans une solution saline stérile) dans le tissu sous-cutané (s.c.) au niveau de la région sous-costale, permettant une libération continue d'Ang II à une dose de 400 ng/kg/min. La chirurgie terminée, les rats éveillés étaient libres de bouger dans leur cage, ayant accès à de l'eau ainsi qu'à leur nourriture grâce à l'emplacement d'un harnais, protégeant leurs cathéters (338).

Afin de pouvoir marquer et mesurer le taux de protéines nouvellement synthétisées, nous avons eu recours à l'utilisation d'un isotope radioactif, soit la leucine- ^3H (339, 340). Le but est d'arriver à obtenir un équilibre dans la disponibilité de l'isotope afin que le turnover protéique puisse être calculé par la mesure du taux d'incorporation dans les protéines nouvellement synthétisées. Toutefois, le mode d'administration de cet isotope radioactif devait être déterminé. Selon la littérature, deux techniques d'administration, soit par bolus (injection rapide d'une forte concentration d'acide aminé radiomarqué) soit par perfusion (introduction lente et continue d'un traceur radioactif) pouvaient être envisagées. Chez les animaux de laboratoire où il est possible de prélever directement les tissus, la technique de perfusion continue d'un acide aminé radiomarqué est la méthode la plus utilisée pour mesurer les cinétiques de protéines *in vivo* (339, 341, 342). Pour fin de vérification, nous avons effectué une série d'expériences préliminaires (administration de leucine par perfusion, bolus ou les deux ensembles) afin de déterminer la méthode optimale d'incorporation du traceur radioactif (leucine- ^3H) dans les protéines nouvellement synthétisées. Les résultats de ces expériences ont révélé que la méthode de perfusion constante de leucine- ^3H était la plus appropriée lorsqu'effectuée pendant une

période de quatre heures. Les valeurs obtenues étaient suffisamment élevées et reproductibles. Dans ces conditions, nous avons remarqué une augmentation rapide et significative du taux de synthèse protéique après la perfusion d'Ang II. Afin d'optimiser nos conditions expérimentales chez l'animal éveillé, nous avons évalué: 1) la quantité de leucine- ^3H à administrer, 2) la durée du traitement à l'Ang II et 3) la distribution tissulaire du traceur, ne devant pas être modifiée par les traitements. Nos résultats ont montré que la quantité totale de radioactivité dans les tissus, mesurée avant l'extraction des protéines, était similaire chez les rats témoins et les rats traités à l'Ang II, suggérant que les divers traitements n'ont provoqué aucune modification dans la distribution tissulaire de la leucine- ^3H (résultats non publiés). Le protocole final, décrit ci-dessous, a été utilisé dans chacune des expériences subséquentes.

C'est à la suite des 22 heures de perfusion constante d'Ang II que la leucine- ^3H (48 μCi dans une solution saline de 2 mL NaCl 0.9%) a été perfusée i.v. pendant une période de quatre heures à l'aide d'un pousse-seringue, réglé à un débit de 0,5 ml/h (soit 12 $\mu\text{Ci/h}$). Les rats du groupe témoin ont reçu la perfusion de leucine- ^3H ainsi que le véhicule de l'Ang II 22 heures après l'emplacement des cathéters.

En ce qui concerne les agents pharmacologiques visant à modifier le taux de synthèse protéique, ils ont été administrés par une injection bolus i.v. après 21 heures de perfusion d'Ang II (soit une heure avant la perfusion de leucine- ^3H) (figure 2.1). Les agents ainsi que les doses utilisées seront détaillés au chapitre 3 (résultats). Par ailleurs, une autre série d'expériences comprenait des rats traités à l'Ang II qui ont reçu l'irbésartan, un antagoniste sélectif des récepteurs AT_1 suivant le même protocole expérimental que décrit précédemment. Contrairement à nos attentes, les résultats de ces expériences n'ont montré que très peu d'effets sur la synthèse protéique (Tableau 3.2, voir section 3.1.4). Nous avons donc opté pour une administration plus longue de l'irbésartan. Ainsi, L'irbésartan a été administré par voie s.c. en deux doses, soit au moment de l'implantation de la pompe osmotique d'Ang II et 12 heures plus tard (figure 2.2). Ce protocole expérimental a été répété chez des rats témoins.

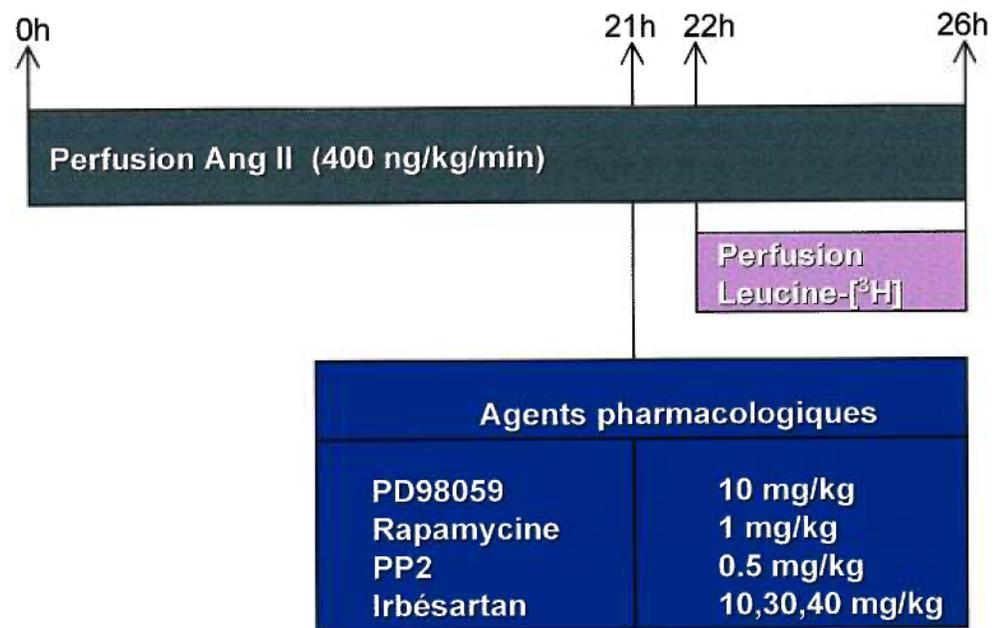


Figure 2.1: Schéma représentant le protocole expérimental pour l'administration intraveineuse (i.v.) des agents pharmacologiques (PD98059, rapamycine, PP2, irbésartan).

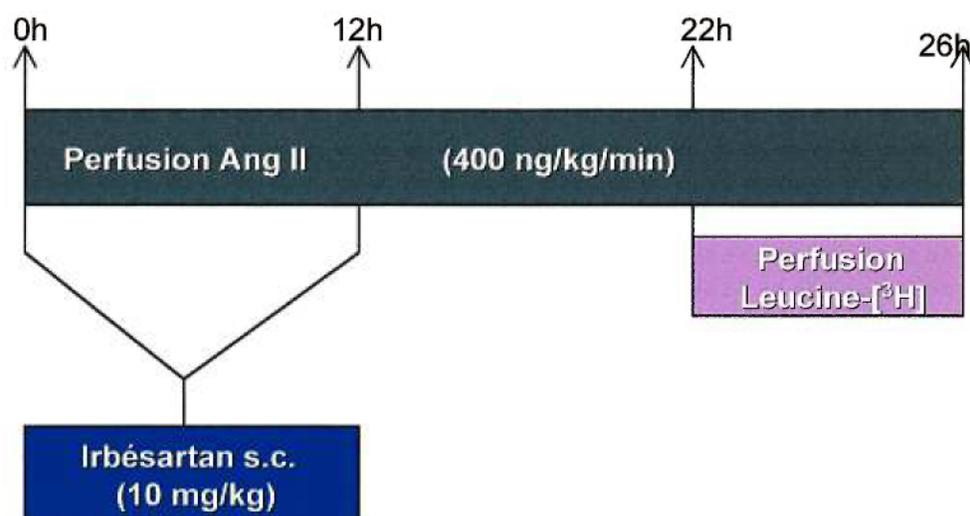


Figure 2.2: Schéma représentant le protocole expérimental pour l'administration sous-cutanée (s.c.) de l'irbésartan, un antagoniste des récepteurs AT_1 .

Tous les inhibiteurs et antagonistes ont été obtenus chez Calbiochem, sauf pour l'irbésartan qui nous a été généreusement offert par Bristol-Myers Squibb. Les agents pharmacologiques ont été solubilisés dans leur véhicule respectif, puis soniqués (ultrason), les rendant injectables via le cathéter veineux. Le PD98059 a été mis en suspension dans une solution polymérique à 1%, soit le Pluronique F68 (véhicule), puis soniqué avant son administration. Une série de rats témoins et traités à l'Ang II ont également reçu le véhicule, et aucun effet sur la synthèse protéique n'a été observé; ces animaux (n = 3/groupe) ont été regroupés avec les autres. D'autre part, la rapamycine a été mise en suspension dans le carboxyméthylcellulose à 0.2% (CMC) à une concentration de 1mg/ml, passée aux ultrasons, aliquotée puis congelée. Juste avant son administration, la rapamycine a été diluée davantage dans le CMC (0.2%) puis passée aux ultrasons. La préparation du PP2 était identique à celle de la rapamycine.

La pression artérielle (systolique, diastolique et moyenne) a été enregistrée de façon continue à l'aide d'un capteur de pression relié à un système d'acquisition de données chez les rats éveillés et libres dans leur cage, 15 minutes avant, ainsi que pendant l'administration du médicament, incluant aussi les quatre heures de perfusion de leucine-[³H].

À la fin des traitements, les rats ont été anesthésiés (pentobarbital 35 mg/kg i.v.), nous permettant d'effectuer un prélèvement sanguin ainsi que l'extraction de divers tissus dont l'aorte, le mésentère et le ventricule gauche du cœur. Ces tissus ont immédiatement été transférés dans une solution froide modifiée de bicarbonate Krebs-Ringer (composition en mmol/L : NaCl 118.6; KCL 4.8; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25.1; Na⁺², Ca²⁺ - EDTA 0.026; glucose 10.1). L'aorte et les ramifications de l'artère mésentérique supérieure (de premier ordre et en décroissant) ont été isolées de leurs tissus environnants, puis gelées dans de l'azote liquide. Le ventricule gauche a été congelé sans autre modification.

2.2. Mesure de la synthèse protéique:

Afin de mesurer l'incorporation de leucine- ^{3}H dans les petites et grosses artères, nous avons utilisé une méthode dérivée de celle de McNulty et al. (339). Les tissus sont pulvérisés avec de la glace sèche et de l'azote liquide, puis la quantité totale de tissu réduite en poudre est divisée en deux portions pesées. Nous précipitons les protéines avec une quantité d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% qui varie selon le poids du tissu pulvérisé; 250 μl pour 50 mg et moins, 500 μl pour 50 à 100 mg, 750 μl pour 100 à 150 mg, 1000 μl pour 150 à 200 mg, les tissus laissés en contact avec le TCA pendant 18h à 4°C.

La première portion de chaque tissu est utilisée pour mesurer l'incorporation de leucine- ^{3}H . Chaque tissu est rincé une première fois dans 750 μl de TCA (10%), puis deux fois dans 750 μl d'eau afin d'éliminer la leucine non-incorporée. Une expérience complémentaire nous a permis de confirmer que des rinçages additionnels ne permettaient pas d'éliminer plus de radioactivité libre. Le culot est alors solubilisé dans de l'hydroxyde de potassium (KOH) 1M. La quantité de KOH varie selon le poids du tissu pulvérisé (mesuré avant le début des rinçages), selon l'échelle suivante: 1 ml de KOH avec un échantillon de tissu de 10 mg ou moins, 2 ml avec 25 mg, 3 ml avec 50 mg, 4 ml avec 75 mg et 5 ml avec 100 mg. Afin de mesurer la radioactivité à l'aide d'un compteur de scintillation, nous ajoutons 1 ml de la solution de KOH dans 10 ml de liquide de scintillation. Les résultats obtenus sont en cpm/mg de tissu.

La deuxième portion de chaque tissu est utilisée pour mesurer la quantité de protéines dans le tissu. Cette fois-ci, chaque tissu est rincé une fois dans 750 μl de TCA (10%), puis solubilisé dans de l'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1M (aux mêmes quantités que pour le KOH) afin de permettre la mesure du contenu protéinique d'après la méthode de Lowry (343). Cette méthode est une réaction colorimétrique dont l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm impliquant l'albumine bovine comme substance étalon. Les résultats obtenus sont en mg de protéines/mg de tissu. Les valeurs finales sont exprimées en cpm/mg de protéines et représentent le taux de synthèse protéique pendant une période de quatre heures (figure 2.3).

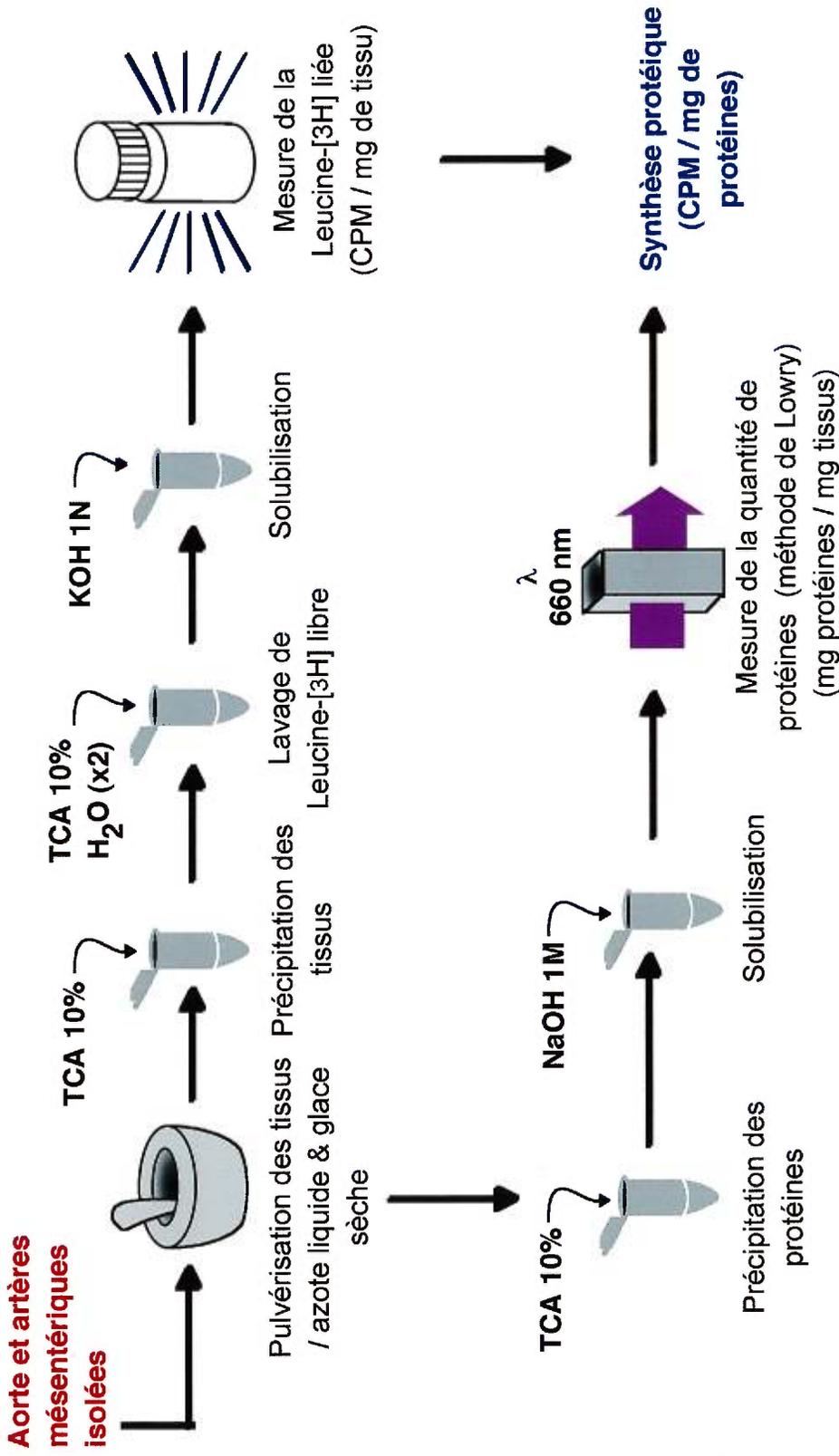


Figure 2.3: Mesure de la synthèse protéique (voir texte pour abréviations).

2.3 Analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm l'erreur-type, et les nombres d'animaux (n) sont présentés dans la légende des figures retrouvées au chapitre 3 (section 3.1.4.). Les analyses statistiques ont été faites par ANOVA, suivies d'une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. Les comparaisons étaient les suivantes: Ang II et traitement pharmacologique seul vs témoin, Ang II + traitement pharmacologique vs Ang II seule. La valeur de $P < 0.05$ est considérée comme étant significative.

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1 “ Signaling events mediating angiotensin II-induced vascular protein synthesis *in vivo*”

Christine Daigle, B.Sc., Fabrice M.A.C. Martens¹, B.Med., Daphné Girardot, B.Sc., Huy Hao Dao, M.Sc, Rhian Touyz², M.D., Ph.D. and Pierre Moreau, Ph.D.

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada

¹Current affiliation: University Hospital of Utrecht, The Netherlands

²Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Qc. Canada

Abbreviated title: Vascular angiotensin II signaling in vivo

Keywords: Hypertrophy - Resistance arteries - Conduit arteries – Rapamycin – ERK

Address for correspondence:

Pierre Moreau, Ph.D.
Assistant Professor, Faculty of Pharmacy
Université de Montréal
2900 Edouart-Montpetit, Room R-313
P.O. Box 6128, Stn « Centre-ville »
Montréal, Qué., H3C 3J7, Canada
Phone: (514) 343-6111 x3342
Fax.: (514) 343-2102



(Sera soumis à *Hypertension*)

3.1.1 Abstract

From *in vitro* studies, it has become clear that several signaling cascades are involved in angiotensin II-induced cellular hypertrophy. The aim of the present study was to determine the signaling effectors mediating Ang II-induced vascular protein synthesis *in vivo* in arteries with different physiological functions. By labeling newly synthesized proteins with tritiated leucine in conscious animals, we observed that 24 hours of 400 ng/kg/min angiotensin II nearly doubled protein synthesis rate in the aorta and small mesenteric arteries, without affecting arterial pressure. This effect on protein synthesis was associated with enhanced aortic, but not mesenteric extracellular signal-regulated kinases (ERK)-1/2 activity. Accordingly, systemic administration of PD98059, an inhibitor of ERK-1/2, showed a marked reduction of protein synthesis rate in the aorta, but a limited effect in mesenteric arteries. Rapamycin, which influences protein synthesis by a more complex mechanism, had a significant effect in both vessel types. Rapamycin and PD98059 did not alter basal protein synthesis and had minimal effects on arterial pressure. The AT1 receptor antagonist Irbesartan antagonized the effect of Ang II. We conclude that ERK1/2 and rapamycin-sensitive pathways are involved in pressure-independent angiotensin II-induced vascular protein synthesis *in vivo*, but that their relative contribution may vary depending on the function of the artery under investigation.

3.1.2 Introduction

Angiotensin II (Ang II) has a substantial role in the normal and pathological physiology of the vessel wall. Indeed, in addition to being a vasoactive peptide, this multifunctional hormone stimulates hypertrophy of isolated vascular smooth muscle cells (VSMC), as a result of enhanced protein synthesis (9). Chronic administration of Ang II has been shown to promote significant changes in vascular structure, leading to pressure-independent hypertrophic remodeling of small arteries (11, 17, 24). In large arteries, exogenous Ang II first induces hypertrophy, which is followed by increased DNA synthesis (7, 14).

Activation of the Ang II-receptor subtype 1 (AT_1) is essential for the vascular effects of Ang II, a fact clearly established by studies using various AT_1 blockers. Binding of Ang II with the AT_1 receptor triggers a complex series of intracellular signaling events activating protein kinase cascades acting synergistically to increase the global rate of protein synthesis (3, 25). *In vitro* studies identified at least two independent signaling pathways directly linked to protein synthesis (10, 21, 22). Activation of a member of the mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK-1 or p44^{mapk}) and ERK-2 (p42^{mapk}), represents one of these pathways (10, 28). The double threonine/tyrosine phosphorylation and activation of ERK-1/2 by MEK can be blocked selectively by the synthetic compound PD98059 (1, 8, 22). Using this compound, Servant *et al.* demonstrated that the ERK-1/2 signaling pathway is a necessary element in Ang II-induced protein synthesis in VSMC (22).

Activation of the AT_1 receptor also stimulates the phosphorylation and enzymatic activity of the 70-kD S6 kinase (p70^{S6k}) in VSMC (10), which is the major physiologic kinase for ribosomal protein S6, a component of the 40S ribosomal subunit (19). It is known that p70^{S6k} is implicated in Ang II-induced protein synthesis in rat aortic VSMC and cardiac myocytes (10, 21). Indeed, *in vitro* studies have shown that rapamycin, an immunosuppressive agent, selectively abolishes activation (phosphorylation) of p70^{S6k}, and consequently of protein synthesis (10, 21). Rapamycin likely acts by preventing the auto-phosphorylation of the FKBP-rapamycin associated protein/mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR), a

phosphoinositide-related kinase (4). FRAP/mTOR is an upstream regulator of p70^{S6K} activity, but also of other modulators of protein synthesis (see discussion) (19, 25).

Thus, *in vitro* studies clearly indicate that Ang II activates cascades involving ERK-1/2 and p70^{S6K}, which both contribute to enhanced protein synthesis. However, Ang II signaling is complex and little is known about the *in vivo* contribution of these signaling pathways to the vascular effect of Ang II. In addition, a different contribution of signaling cascades in arteries with different physiological function is a plausible hypothesis that deserves investigation. These issues represent the aim of the present study and to address them, we devised a model that allows the measure of vascular protein synthesis *in vivo*. We then compared the efficacy of PD98059 and rapamycin to modulate protein synthesis in conduit (aorta) and small arteries from the mesenteric circulation.

3.1.3 Materials and Methods

3.1.3.1 Animals and treatments:

Male Sprague-Dawley rats weighing 300-325 g (obtained from Charles River Laboratories, Que., Canada) were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, i.p.) for insertion of a polyethylene catheter (PE10 segment welded to a PE50) into the femoral artery and vein. In some animals, an osmotic pump (model 1003D Alzet®) was implanted subcutaneously in the subcostal region, releasing a constant dose of 400 ng/kg/min of Angiotensin II. (These osmotic pumps were primed in a sterile saline solution one day prior to surgery.). Rats were then free to move and had access to food and water, with a tethering system protecting the catheters (18).

Following 22 hours of Angiotensin II infusion, a saline solution containing L-(3,4-³H) leucine was infused i.v. during 4 hours at a rate of 12 μ Ci/hour. Control rats received leucine infusion alone, 22 hours after catheter implantation. At the end of treatments, animals were anesthetized (pentobarital 35 mg/kg i.v.) and exsanguinated. The thoracic aorta and the mesenterium were then collected and immediately transferred in a modified cold Krebs-Ringer bicarbonate solution (composition in mmol/L: NaCl 118.6; KCl 4.8; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25.1; Na⁺₂, Ca²⁺-EDTA 0.026; glucose 10.1). The aorta and small ramifications of the

superior mesenteric artery (first order and smaller) were freed from surrounding tissue and frozen in liquid nitrogen.

Pharmaceutical agents were administered by i.v. bolus injection following 21 hours of Angiotensin II infusion (one hour prior to [³H]-leucine infusion). Ang II-treated rats received the synthetic compound PD98059 at doses of 1 mg/kg (n = 6), 5 mg/kg (n = 7) and 10 mg/kg (n = 6). A group of control rats received 10 mg/kg PD98059 (n = 4). In a second set of experiments, rapamycin was injected at doses of 0.1 mg/kg (n = 8), 0.5 mg/kg (n = 6) and 1 mg/kg (n=3) in Ang II-treated rats. Six control rats received 0.5 mg/kg rapamycin. In a third series, Ang II-treated rats received irbesartan, a selective AT-1 receptor blocker, at doses of 10 mg/kg (n = 9), 30 mg/kg (n = 5) and 40 mg/kg (n = 5), following the same experimental protocol. Additional rats were treated with irbesartan according to a different treatment scheme. Irbesartan was administered subcutaneously at the time of surgery and 12 hours later (10 mg/kg at each occasion) in Ang II-treated (n = 8) or in control rats (n = 6). We used two sets of control and Ang II-treated rats to confirm the reproducibility of the method. The first set (n = 10 and 10, respectively) was studied simultaneously to PD98059 and irbesartan groups. The second set (n = 7 and 9, respectively) was studied in parallel with the rapamycin experiments. Finally, three additional control and Ang II-treated rats were used to test vascular ERK-1/2 activity. These last animals were sacrificed 21 hours after the beginning of Ang II administration, to determine ERK-1/2 activity at the time when PD98059 was normally injected.

Arterial pressure was continuously measured intra-arterially in freely moving rats 15 minutes before and following drug administration, including during leucine infusion. Mean arterial pressure (MAP) was averaged over these last five hours.

3.1.3.2 Protein Synthesis Measurement:

In order to measure leucine incorporation in small and conduit arteries, we used a method derived from that of McNulty et al. (16). Tissues were pulverized with dry ice and liquid nitrogen conditions and the total amount of powder was divided into two weighed portions. To the first portion, 5 volumes 10 % trichloroacetic acid (TCA) were added and the samples were left overnight at 4 °C. Tissues were then rinsed once in the same amount of 10 % TCA and twice in water to wash non-

incorporated leucine. We confirmed that additional washings did not remove more radioactivity. The pellet was solubilized in potassium hydroxide (KOH 1M) and radioactivity was measured with a Packard Liquid Scintillation Analyzer. Results obtained are in CPM/mg of tissue. The second portion of pulverized tissue was also left overnight in 10% TCA, and then solubilized in sodium hydroxide (NaOH 1M) for measurement of protein content by the method described by Lowry (15). Results obtained were in mg of proteins/mg of tissue. The final data is expressed as CPM/mg protein and represents the rate of protein synthesis over a 4-hour period. Total tissue radioactivity, measured before protein extraction, was similar in additional control and Ang II-treated rats, suggesting that the availability of [³H]-leucine was not modified by treatments (data not shown).

3.1.3.3 ERK-1/2 activity determination:

To confirm that Ang II does stimulate the ERK-1/2 pathway in *in vivo* conditions, its activity was determined by western blot, using a phosphospecific antibody, as previously described (27). Frozen aortas and mesenteric arteries were pulverized in dry ice and liquid nitrogen and homogenized using a polytron in ice-cold lysis buffer (PBS 20 %, Igepal CA-630 1 %, Na-deoxycholate 0,5 %, SDS 0.1 %, PMSF 0.25 %, aprotinine 0.1 %). After 30 minutes of incubation at 4°C, the protein supernatant was separated by centrifugation (4 °C, 30 min, 14 000 g) and protein concentration determined with a Micro BCA Protein Reagent Kit (Pierce). Equal amounts of proteins (20 µg) were loaded in each wells of a 4 % SDS-PAGE acrylamide stacking gel and separated by a 10 % SDS-PAGE acrylamide gel. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Fisher Scientific) during 24 hrs at 4 °C and 25 mV. A blocking buffer (tris-buffered saline, 0.1 % Tween-20 (TTBS) and 5 % w/v non-fat dry milk) was incubated for 3 hrs at room temperature. The membrane was first washed with TTBS and then incubated for 24 hrs at 4 °C with a phospho-specific ERK1/2 antibody (p44/p42 MAPK (T202/Y204) E10 monoclonal antibody, New England Biolabs, final dilution 1:2000). The membrane was washed and incubated for 2 hrs at room temperature with a sheep anti-mouse IgG, peroxidase-linked antibody (Amersham Pharmacia Biotech), diluted 1:2000. After the final wash, the membrane was incubated for 1 min with ECL

western blotting reagents (Amersham Pharmacia Biotech), exposed on Hyperfilm ECL (Amersham) which was subsequently developed. The film was scanned and the optical density quantified using NIH Image.

3.1.3.4 Drugs and Statistical Analysis:

All drugs were purchased from Calbiochem. Irbesartan was a kind gift from Bristol-Myers Squibb. PD 98059 was suspended in a 1% polymeric solution (Pluronic F68) and sonicated (ultrasound) prior to administration. A series of control and Ang II-treated rats also received the vehicle and no effect was noted on protein synthesis. These animals (n=3/group) were pooled with the others. Rapamycin was suspended in 0.2% carboxymethylcellulose (CMC) by sonication, aliquoted and frozen. Prior to its administration, rapamycin was further diluted in CMC and sonicated.

Data are presented as mean \pm s.e.m. and the number of animals is presented in the methods section. Statistical analysis was done by ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons. A priori comparisons were: Ang II and drugs alone vs control, and drugs + Ang II vs Ang II alone. $P < 0.05$ was considered significant.

3.1.4 Results

Angiotensin II stimulated protein synthesis by 72% in the aorta and by 80% in mesenteric arteries (Figure 3.1). This response was reproduced on a second occasion (91 and 105%, respectively, figure 3.3), confirming the validity of the method. At the dose used, Ang II administration did not elevate arterial pressure as compared to control rats (Table 1).

3.1.4.1 ERK-1/2 Pathway

PD98059, a selective MEK inhibitor, had no significant effect on aortic and mesenteric protein synthesis when administered alone at 5 mg/kg (Figure 3.1). Given at the dose of 1 mg/kg, PD98059 had no effect on Ang II-induced protein synthesis in the aorta and mesenteric bed. At 5 mg/kg, there was a trend for a reduction in protein synthesis rate in the mesenteric bed, while that of the aorta was unaffected.

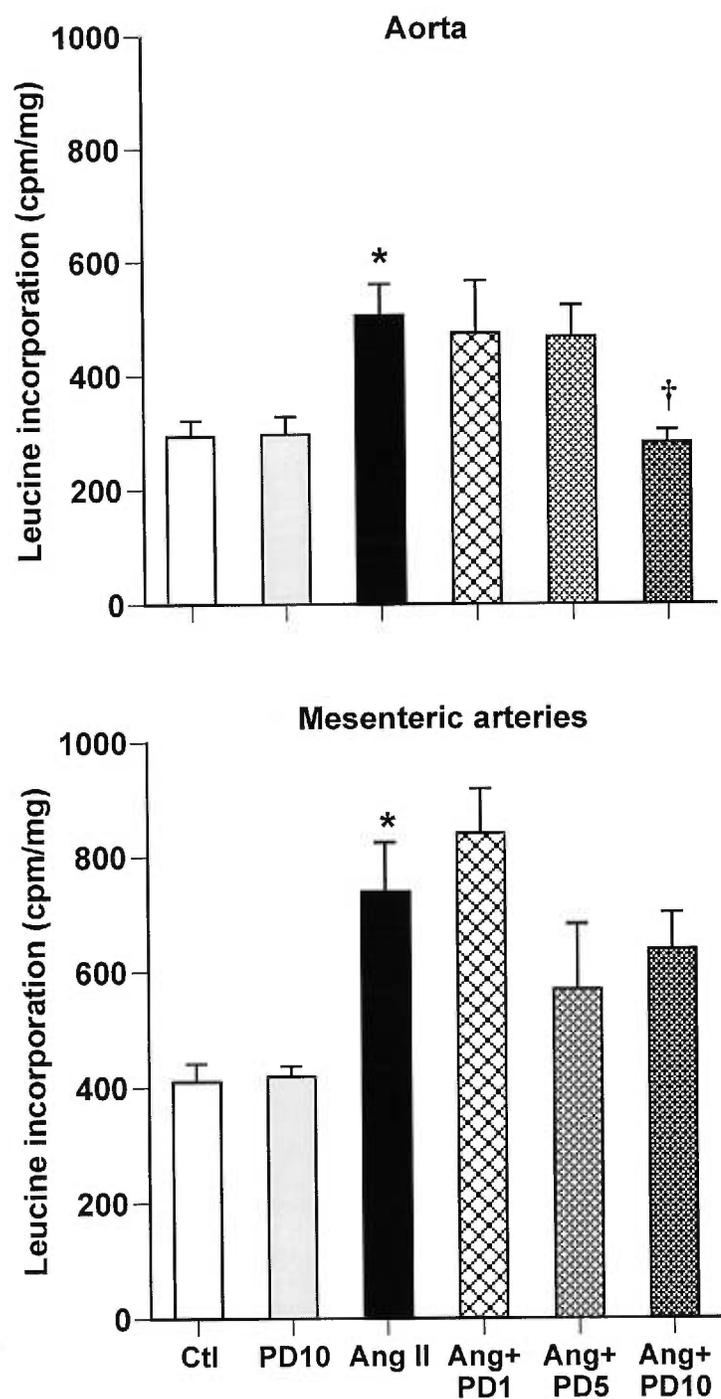


Figure 3.1: Effect of ERK1/2 activity inhibition with PD98059 (1, 5 and 10 mg/kg) on protein synthesis rate in the aorta and small mesenteric arteries. The effect of the drug was tested in basal conditions and after Angiotensin II (Ang II)-induced protein synthesis. * $P < 0.05$ vs Ctl; † $P < 0.05$ vs Ang II alone (ANOVA + Bonferroni).

At the maximum dose used, the MEK inhibitor in the presence of Ang II did not produce a further reduction in protein synthesis in small arteries, but totally blocked it in the aorta (107% reduction, Figure 3.1). Antibodies directed against the active (phosphorylated) form of ERK-1/2 confirmed that their aortic activity doubled following Ang II administration (Figure 3.2). In contrast, however, ERK-1/2 activity was not enhanced in mesenteric arteries. The acute administration of PD98059 had no influence on MAP averaged over the five hours following its administration (Table 3.1).

3.1.4.2 Rapamycin-sensitive Pathway

When administered alone as an i.v. bolus, 0.5 mg/kg rapamycin had no effect on protein synthesis in the mesenteric bed, nor in the aorta (Figure 3.3). When protein synthesis was first stimulated by Ang II, rapamycin produced a significant reduction in mesenteric arteries, reaching a maximum of 84% at 0.5 mg/kg. As with PD98059, the effect in the aorta improved further at the highest dose, reaching 76% reduction at 1 mg/kg (Figure 3.3). The highest dose of rapamycin increased mean arterial pressure averaged over the course of its administration, by 10 mmHg (Table 3.1).

3.1.4.3 AT₁ Receptor antagonism

Using the same experimental protocol as in the previous experiments, we administered irbesartan, a specific and selective AT₁ receptor blocker, one hour prior to leucine infusion. In both aorta and small mesenteric arteries, irbesartan at 10, 30 and 40 mg/kg had no significant effect on Ang II-induced increase in protein synthesis (Table 3.2). However, when administered at the beginning and 12 hours after the start of Ang II infusion (2x10 mg/kg), irbesartan totally abolished the trophic effect of Ang II in both vascular beds (Figure 3.4). In addition, irbesartan administered alone had a tendency to reduce protein synthesis in the aorta. This tendency reached statistical significance in the mesenteric arteries. The blood pressure lowering effect of irbesartan was similar in both treatment regimens (Table 3.1).

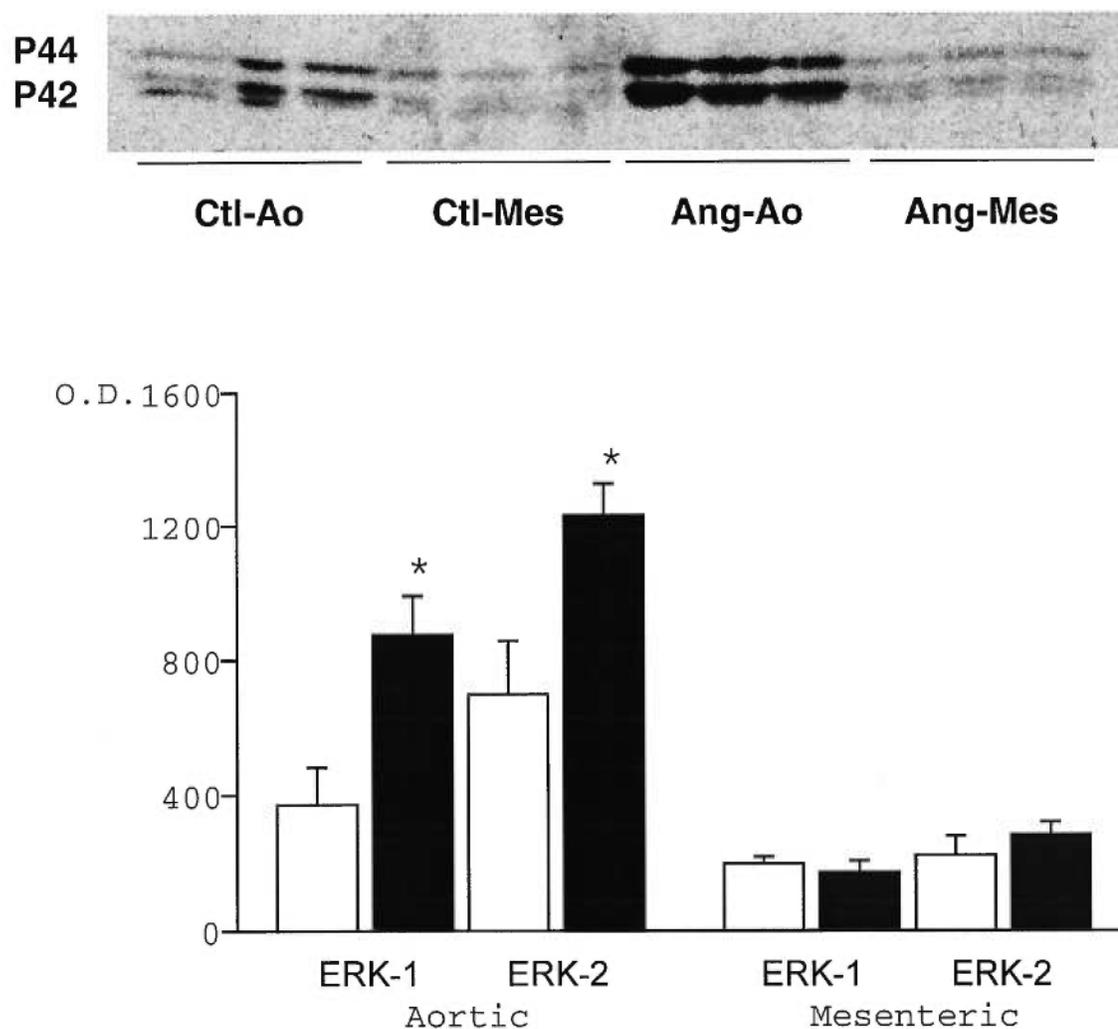


Figure 3.2 : Western blot analysis of aortic protein samples prepared from three control (first 3 wells) and three Ang II-treated rats. The bar chart represents the mean optical density of the three experiments for both ERK-1 (p44mapk) and ERK-2 (p42mapk) in control (open bars) and Ang II-treated animals (filled bars). * P < 0.05 vs Ctl; (unpaired t-test).

Treatment	MAP: pre-drug (mm Hg)*	MAP: post-drug (mm Hg)
Control		103 ± 5
Ang II		105 ± 7
Ang II + PD 1 mg/kg	122 ± 6	117 ± 10
Ang II + PD 5 mg/kg	119 ± 4	111 ± 5
Ang II + PD 10 mg/kg	115 ± 4	113 ± 2
Ang II + Irb 10 mg/kg	110 ± 9	81 ± 5 *
Ang II + Irb 30 mg/kg	106 ± 5	64 ± 6 *
Ang II + Irb 40 mg/kg	127 ± 10	62 ± 4 *
Irb 2x10 mg/kg		75 ± 1
Ang II + Irb 2x10 mg/kg		84 ± 2
Control		112 ± 3
Rap 0.5 mg/kg	98 ± 10	95 ± 10
Ang II		114 ± 7
Ang II + Rap 0.1 mg/kg	101 ± 9	93 ± 9
Ang II + Rap 0.5 mg/kg	109 ± 4	109 ± 2
Ang II + Rap 1.0 mg/kg	111 ± 5	123 ± 1 *

Table 3.1: Mean arterial pressure before and after drug administration.

Data is presented as mean ± sem * P < 0.05 vs Pre-drug (paired t-test).

†For control and Angiotensin II-treated animals that did not receive further acute treatments, only one pressure is presented. MAP Pre-drug: mean arterial pressure before acute drug administration; MAP post-drug: MAP averaged during the 5 hours following acute drug administration; PD: PD98059; Rap: Rapamycin; Irb: Irbesartan.

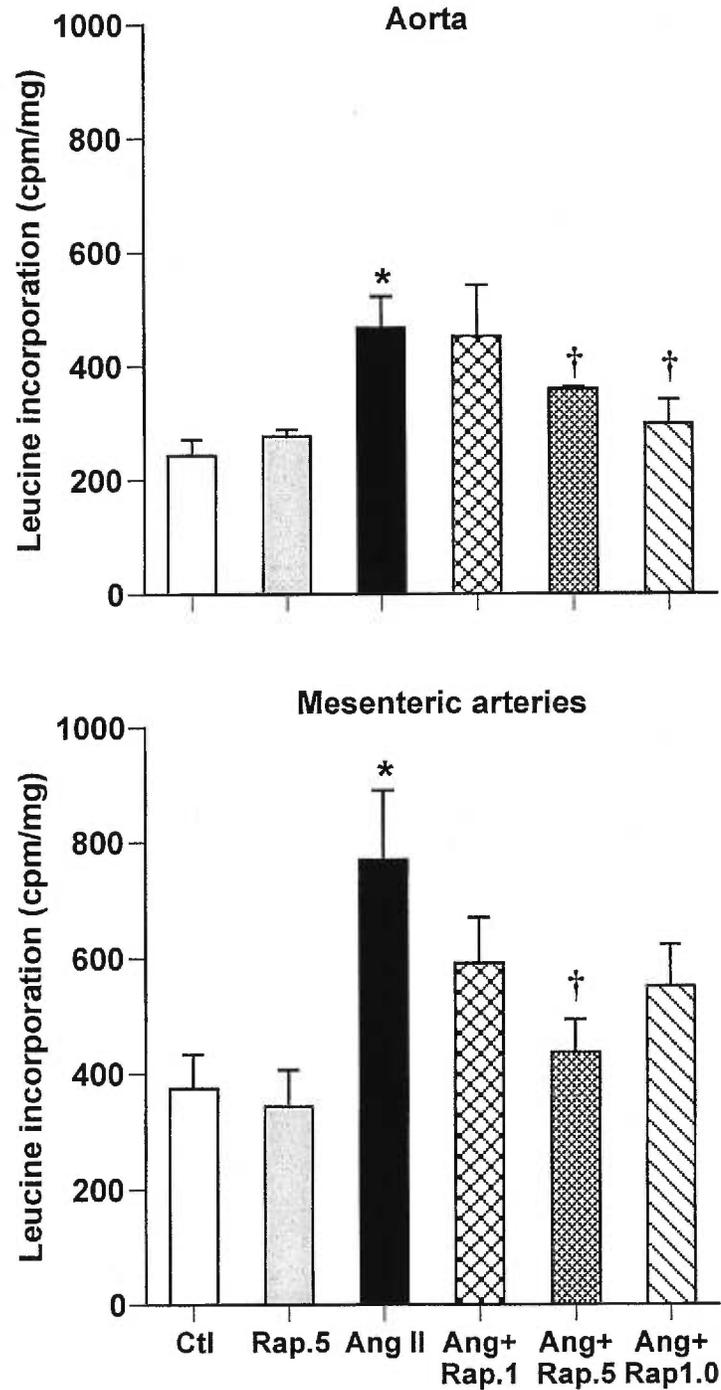


Figure 3.3: Effect of Rapamycin (0.1, 0.5 and 1 mg/kg) on protein synthesis rate in the aorta and small mesenteric arteries. The effect of the drug was tested in basal conditions and after Angiotensin II (Ang II)-induced protein synthesis. * $P < 0.05$ vs Ctl; † $P < 0.05$ vs Ang II alone (ANOVA + Bonferroni).

Treatment	Aorta (cpm/mg)	Mesenteric arteries (cpm/mg)
Control	273 ± 20	375 ± 59
Ang II	421 ± 41*	769 ± 121*
Ang II + Irbesartan 10 mg/kg	567 ± 127	697 ± 91
Ang II + Irbesartan 30 mg/kg	433 ± 56	678 ± 112
Ang II + Irbesartan 40 mg/kg	546 ± 75	644 ± 74

Table 3.2: Protein synthesis in the aorta and mesenteric arteries of rats treated acutely with the AT1-receptor antagonist Irbesartan.

* P < 0.05 vs Control for angiotensin II (Ang II) only.

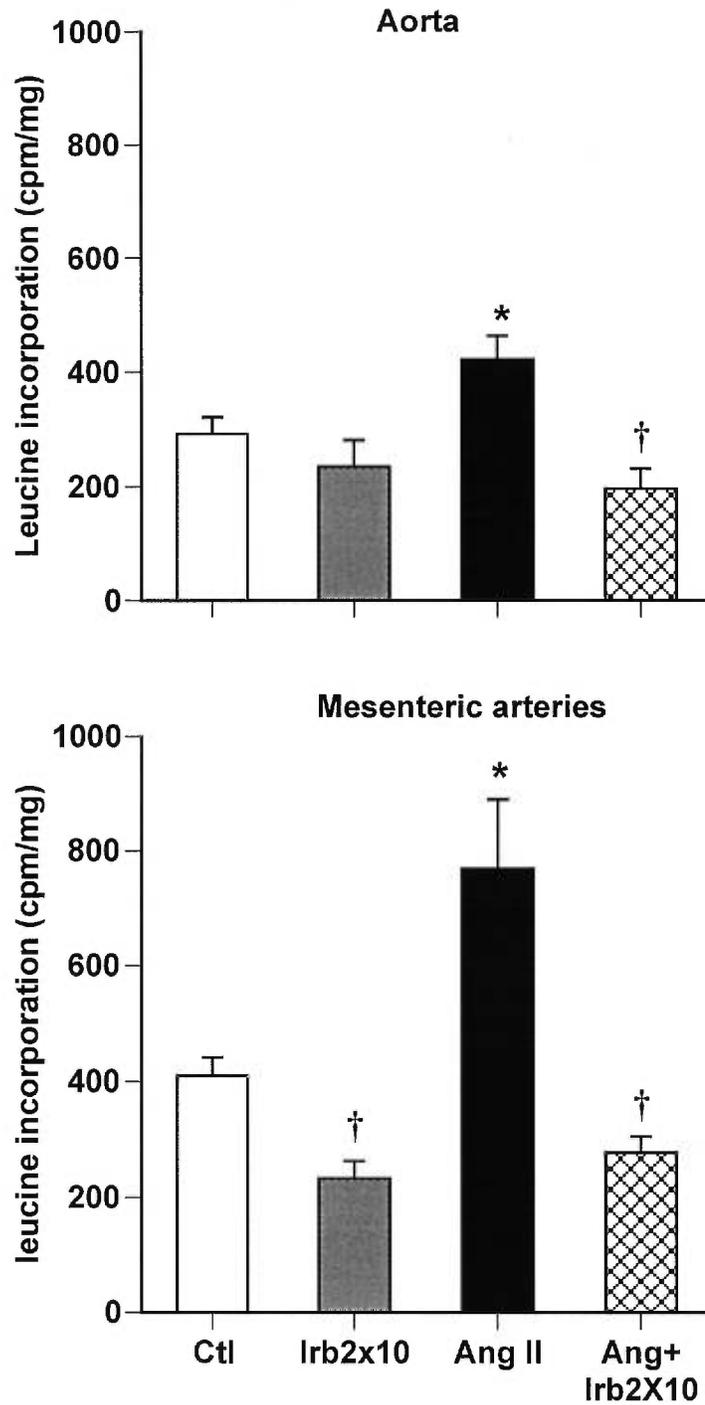


Figure 3.4: Effect of Irbesartan (10 mg/kg s.c. twice at 12 hours interval) on basal and Angiotensin II (Ang II)-stimulated protein synthesis in the aorta and small mesenteric arteries. * $P < 0.05$ vs Ctl; † $P < 0.05$ vs Ang II alone (ANOVA + Bonferroni).

3.1.5 Discussion

Ang II is a trophic factor in several cell types, including VSMC in culture (9, 10). Accordingly, chronic *in vivo* administration of the peptide produces a pressure-independent hypertrophy of the vascular wall (11, 17, 24, 26). Both hypertrophy and DNA synthesis have been reported, although protein synthesis seems to precede DNA replication (7, 14). To the best of our knowledge, the present study represents the first direct demonstration of an increased protein synthesis in the vascular wall *in vivo* following Ang II administration. Our results are in agreement with a study of *ex vivo* protein synthesis measurement in tissues extracted from rats previously treated with Ang II (23). The enhanced protein synthesis occurred without any significant change in arterial pressure, lending direct support to the concept that Ang II exerts a vascular trophic action independently from pressure changes, a concept previously derived mainly from indirect studies using antihypertensives or other strategies (11, 24, 26).

Angiotensin II initiates complex cellular signaling events, and it appeared imperative to determine which pathways are operative *in vivo*, while also examining for potential vascular heterogeneity. Among the MAP kinase cascades identified, the ERK1/2 pathway has been implicated in Ang II-induced protein synthesis (22). The development of PD98059, which selectively inhibits the phosphorylation and activation of ERK by MEK (1, 8, 22), has been a key element to better understand the participation of this cascade in cellular events, using *in vitro* cell culture systems. Our results with the inhibitor strongly suggest that this pathway is an important component for Ang II-induced elevation of aortic protein synthesis *in vivo*. In addition, we could show a significant increase in ERK-1/2 activity following Ang II administration, explaining the efficacy of the inhibitor. However, in small arteries PD98059 only tended to limit Ang II-induced protein synthesis. This correlates well with the apparent inability of Ang II to stimulate ERK-1/2 activity in these vessels, as demonstrated in the present study. Thus, it appears as though arteries with different physiological function may use different signaling events to enhance their protein synthesis with Ang II.

Rapamycin is another compound that inhibits VSMC protein synthesis induced by several growth factors, including Ang II (10, 19). *In vitro* studies have clearly demonstrated that the rapamycin-sensitive pathway is independent from the ERK-1/2 MAPK cascade (2, 22), since rapamycin does not modify ERK1/2 activity (22). *In vivo* administration of rapamycin several hours after Ang II showed a marked inhibition of Ang II-induced protein synthesis in mesenteric arteries and in the aorta. Thus, the rapamycin-sensitive signaling cascade is a second pathway operative upon stimulation of vascular protein synthesis *in vivo* in large arteries, but may be predominantly responsible for the Ang II response in small arteries. One likely explanation for the regional heterogeneity could be related to differences in the machinery regulating protein synthesis. PD98059 and rapamycin use different downstream events to influence protein synthesis (25). It has been demonstrated that MAPK pathways (more precisely, ERK and p38) appear to converge at a common kinase called MNK1 (for MAP kinase interacting protein kinase 1) (30). This kinase efficiently phosphorylates and activates the mRNA 5' cap-binding protein eIF4E, which seems to be the rate-limiting step in cap-dependent mRNA translation (20, 25). In contrast, rapamycin inhibits FRAP/mTOR, which lies in the cascade relaying phosphoinositide 3-OH kinase (PI 3-K) to the phosphorylation and inactivation eIF4E-binding protein (4E-BP1) (29). Phosphorylated 4E-BP1 dissociates from eIF4E, and translation is unrepressed. Thus, rapamycin inhibits protein synthesis by enhancing 4E-BP binding to eIF4E, and not by direct interaction with eIF4E. In parallel, rapamycin, also through its interaction with FRAP/mTOR, prevents the activation of the p70^{s6k}, which also regulates the translation of a subset of mRNAs (13). Thus, it is possible that VSMC in different types of arteries, with distinct physiological roles, may actually regulate their protein synthesis by alternative mechanisms. We propose that VSMC in small arteries are less dependent on the ERK-1/2 signaling cascade than VSMC in large arteries to mediate the trophic effect of Ang II. Alternatively, different relative cellular composition of the vessel wall may also explain our observation. The present study only suggests this heterogeneity and a more appropriate study will be designed to address this hypothesis, which could be of therapeutic value.

In our *in vivo* conditions, ERK1/2 and rapamycin-sensitive pathways seemed to overlap to a great extent in the aorta, where addition of the effect of the two drugs given separately yields an inhibition of more than 180%. Therefore, one may believe that the two pathways are interdependent. Considering the magnitude of inhibition by both drugs alone, combination of PD98059 and rapamycin would not provide additional information on the dependence of the signaling events *in vivo*. An overlap of smaller magnitude has also been reported in cell culture systems, although the pathways were clearly shown to be independent (22). Thus, this overlap remains puzzling and represents an issue that will deserve further investigation and should be addressed at the molecular level. It was also interesting to note that both drugs appeared less potent in the aorta, as higher doses were needed to obtain the maximum effect, as compared to mesenteric arteries. The change in sensitivity may be related to the penetration of the drug, which may be limited by the thick media of the aorta, as compared to small arteries. Alternatively, more cells may have to be affected in the aorta to change the global response.

The role of AT₁-receptors mediating Ang II-induced protein synthesis was confirmed with irbesartan, a potent AT₁-receptor antagonist (5, 12). In addition, the results suggest that endogenous Ang II exerts a tonic effect on protein synthesis, as basal protein synthesis was inhibited by irbesartan. However, this could also be due to the hypotensive effect of irbesartan, as a change in hemodynamic conditions is likely to influence the vessel wall. Although our initial studies (short administration, tables 1 and 2) did not show any influence of pressure reduction on vascular protein synthesis *per se*, the longer period of hypotension observed in the second series of experiments (24 hours of Irbesartan) could still explain the reduction of protein synthesis below physiological levels. Alternatively, unopposed AT₂-receptors may reduce proliferation during AT-receptor blockade (6). Thus, the effect of irbesartan on physiological protein synthesis will deserve further investigation. In contrast, blockade of the ERK-1/2 or the rapamycin-sensitive pathways did not influence basal protein synthesis in large and small arteries, suggesting that these two pathways, which respond to trophic stimuli may not be key elements in protein renewal under physiological conditions. This argues against a significant role of endogenous Ang II to modulate physiological cell protein synthesis, since it seems to use these pathways

for its effect. However, phosphospecific western blots did reveal a degree of ERK-1/2 activity under basal conditions, suggesting that our evaluation of protein synthesis may not be sensitive enough to pick up a small change induced by lowering ERK-1/2 activity below physiological values.

One other aspect that warrants discussion is the time-course of our protocols. When irbesartan was administered according to the same protocol used with PD 98059 and rapamycin, it failed to alter Ang II-induced vascular protein synthesis. However, subcutaneous administration of the drug together with Ang II during 24 hours, totally prevented the trophic effect of Ang II. Thus, it appears that receptor blockade has to be sustained to prevent intracellular signaling activation, while interference with intracellular signaling events can occur at a later time. In fact, the late effect of PD98059 was rather surprising, considering that *in vitro* Ang II-induced activation of ERK-1/2 is transient in nature and seems to fade after 60 minutes (28). We confirmed that ERK-1/2 activity was elevated in the aorta after 21 hours of Ang II administration, corresponding to the injection time of PD98059 or rapamycin. It is thus likely that *in vivo*, ERK-1/2 activation follows a different kinetic than in synchronized cells in culture, allowing a late inhibition to be effective. The contribution of a different activation kinetic to the heterogeneity between large and small arteries remains to be tested.

3.1.6 Limitations and conclusion

The aim of the present study was not to characterize the signaling events up- or downstream of the drug's site of action, but to find the pathways operating *in vivo* in arteries with distinct physiological functions. Cell culture systems represent a better model to study mechanisms and have provided very robust information regarding the selectivity and specificity of the drugs used. Thus, our interpretation of the data is based on the current understanding of the mechanism of action of the pharmacological agents that were used either to antagonize AT₁-receptors or signaling events.

In conclusion, our results obtained in *in vivo* conditions demonstrate that acute Ang II administration at a non-pressor dose leads to vascular hypertrophy by enhancing local protein synthesis. In agreement with previous *in vitro* studies, we show that both ERK1/2 and rapamycin-sensitive signaling pathways are implicated in

Ang II-induced increase in protein synthesis *in vivo*. In contrast to what was suggested from *in vitro* studies, however, late inhibition of the signaling pathways is effective to reduce protein synthesis. In addition, we propose a degree of vascular heterogeneity in the relative implication of ERK1/2 to mediate Ang II-induced protein synthesis. This new information provides a better insight on the signaling events mediating hypertrophy of small and large arteries that could be triggered by elevated levels of Ang II in pathological conditions.

3.1.7 Acknowledgements

This work was supported by operating grants from the Medical Research Council of Canada (MRC, MT-14380), the Fonds Canadiens pour l'Avancement de la Recherche and Bristol Myers Squibb, Canada. PM is a research scholar from the MRC. CD received a studentship from the Société québécoise d'hypertension artérielle, FMACM from the Dutch Kidney Foundation and DG from the "Groupe de recherche sur le système nerveux autonome". The authors are grateful to Dr Sylvain Meloche (Centre de recherche, CHUM, Montréal) for fruitful scientific discussions and his critical review of the manuscript and to Louise Grondin for dedicated technical assistance.

3.1.8 References

1. Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Salteil. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270: 27489-27494, 1995.
2. Ballou, L. M., H. Luther, and G. Thomas. MAP2 kinase and 70K s6 kinase lie on distinct signaling pathways. *Nature* 349: 348-350, 1991.
3. Berk, B. C. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *Journal of the American Society of Nephrology* 10: S62-S68, 1999.
4. Brown, E. J., P. A. Beal, C. T. Keith, J. Chen, T. B. Shin, and S. L. Schreiber. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 377: 441-446, 1995.
5. Cazaubon, C., J. Gougat, F. Bousquet, P. Guiraudou, R. Gayraud, C. Lacour, A. Roccon, G. Galindo, G. Barthelemy, B. Gautret et al. Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT1 subtype angiotensin II receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265: 826-834, 1993.
6. Chung, O., H. Kuhl, M. Stoll, and T. Unger. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney International* 67: S95-S99, 1998.
7. Daemen, M. J. A. P., D. M. Lombardi, F. T. Bosman, and S. M. Schwartz. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circulation Research* 68: 450-456, 1991.
8. Dudley, D. T., L. Pang, S. J. Decker, A. J. Bridges, and A. R. Saltiel. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92: 7686-7689, 1995.
9. Geisterfer, A. A. T., M. J. Peach, and G. K. Owens. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 62: 749-756, 1988.
10. Giasson, E., and S. Meloche. Role of P70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 5225-5231, 1995.
11. Griffin, S. A., W. C. B. Brown, F. Macpherson, J. C. McGrawth, V. G. Wilson, N. Korsgaard, M. J. Mulvany, and A. F. Lever. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-635, 1991.
12. Herbert, J. M., C. Delisee, F. Dol, P. Schaeffer, C. Cazaubon, D. Nisato, and P. Chatelain. Effect of SR 47436, a novel angiotensin II AT1 receptor antagonist,

- on human vascular smooth muscle cells in vitro. *European Journal of Pharmacology* 251: 143-150, 1994.
13. Jefferies, H. B. J. and G. Thomas. Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction. In: *Translational Control*, edited by J. W. B. Hershey, M. B. Mathews and N. Sonenberg. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, p. 389-410.
 14. Kato, H., J. Hou, A. V. Chobanian, and P. Brecher. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension* 28: 153-158, 1996.
 15. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. Lewis Far, and R. J. Randall. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275, 1951.
 16. McNulty, P. H., L. H. Young, and E. J. Barrett. Response of the rat heart and skeletal muscle protein in vivo to insulin and amino acid infusion. *American Journal of Physiology* 264: E958-E965, 1993.
 17. Moreau, P., L. V. d'Uscio, H. Takase, S. Shaw, M. Barton, and T. F. Lüscher. Angiotensin II increases tissue endothelin and induced vascular hypertrophy in vivo: reversal by ET_A-receptor antagonist. *Circulation* 96: 1593-1597, 1997.
 18. Moreau, P., L. Lamarche, A. K.-Laflamme, N. Yamaguchi, and J. de Champlain. Chronic hyperinsulinemia and hypertension: the role of the sympathetic nervous system. *Journal of Hypertension* 13: 333-340, 1995.
 19. Proud, C. G. p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Trends in Biological Sciences* 21: 181-185, 1996.
 20. Rao, G. N., K. K. Griendling, R. M. Frederickson, and N. Sonenberg. Angiotensin II induces phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 269: 7180-7184, 1994.
 21. Sadoshima, J., and S. Izumo. Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro: potential role of 70-kD S6 kinase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research* 77: 1040-1052, 1995.
 22. Servant, M. J., E. Giasson, and S. Meloche. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 271: 16047-16052, 1996.
 23. Simon, G., and S. Altman. Subpressor angiotensin II is a bifunctional growth factor of vascular muscle in rats. *Journal of Hypertension* 10: 1165-1171, 1992.
 24. Simon, G., G. Illyes, and B. Csiky. Structural vascular changes in hypertension: role of angiotensin II, dietary sodium supplementation, blood pressure and time. *Hypertension* 32: 654-660, 1998.
 25. Sonenberg, N., and A. C. Gingras. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10: 268-75, 1998.

26. Su, E. J., D. M. Lombardi, J. Siegal, and S. M. Schwartz. Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension* 31: 1331-1337, 1998.
27. Touyz, R. M., L. Y. Deng, G. He, H. H. Wu, and E. L. Schiffrin. Angiotensin II stimulates DNA and rprotein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Hypertension* 17: 907-916, 1999.
28. Tsuda, T., Y. Kawahara, Y. Ishida, K. M., S. K., and M. Yokoyama. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubulr associated protein 2 kinases in cultured vascular smoothe muscle cells. *Circulation Research* 71: 620-630, 1992.
29. von Manteuffel, S. R., A.-C. Gingras, X.-F. Ming, N. Sonenberg, and G. Thomas. 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70^{S6k} pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 93: 4076-4080, 1996.
30. Waskiewicz, A. J., A. FLynn, C. G. Proud, and J. A. Cooper. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO Journal* 16: 1909-1920, 1997.

3.2 LES TYROSINE KINASES Src et leur inhibiteur sélectif (PP2)

3.2.1 Introduction

De plus en plus d'évidences suggèrent qu'un membre de la famille de tyrosine kinases Src est un médiateur important dans l'activation des voies de signalisation des récepteurs AT₁ (344, 345) (voir section 1.4.1.2). Plus précisément, Src serait un point d'intégration critique des voies de signalisation dépendantes du Ca²⁺ et de ERK-1/2 dans les CMLV, en réponse à une stimulation par l'Ang II (279). En effet, il a été montré que Src joue un rôle important dans l'activation des MAPK (279), une voie reliée à la synthèse protéique (122, 344, 345) et à la croissance cellulaire (127).

Les membres de la famille Src partagent des domaines structuraux semblables. Ainsi, le domaine N-terminal contient un site consensus de myristoylation ainsi qu'un site de palmitoylation (346). Ce dernier est suivi des domaines régulateurs SH3 et SH2, un domaine catalytique bilobal (son site actif est situé entre deux lobes) ainsi qu'un domaine C-terminal qui contient un résidu tyrosine régulateur (Tyr⁵²⁷ dans Src). Les domaines SH2 et SH3 lient des peptides riches en résidus phosphotyrosine et proline respectivement; par ces interactions, ils jouent un rôle dans la régulation intramoléculaire de l'activité kinase (347).

Un résidu qui semble être critique pour la régulation de c-Src est le résidu tyrosine spécifique Tyr⁵²⁷. La Csk (C-terminal Src kinase), une protéine tyrosine kinase cytoplasmique, régule l'activité des membres de la famille Src en phosphorylant le résidu Tyr⁵²⁷ de l'extrémité régulatrice C-terminale (348), un processus qui résulte en un changement conformationnel (médié par SH2 et SH3) qui inactive l'enzyme (349-351), et donc, inhibe l'activité c-Src (130, 352). D'autres évidences viennent supporter l'importance du rôle que joue Csk dans la régulation de Src. En effet, il semble que l'autophosphorylation sur Tyr³⁹⁴ de Lck, une autre tyrosine kinase de la famille Src, déclenche une interaction avec Csk, facilitant ainsi la phosphorylation et l'inactivation de Lck (348). La phosphorylation d'autres substrats cellulaires par Csk serait possiblement régulée par un mécanisme semblable (348). De plus, une étude a montré que la Csk possède une similarité séquentielle à

Src (353); les kinases reliées à Src partageraient donc une structure tridimensionnelle ainsi que des mécanismes de régulation intramoléculaire semblables.

En plus du domaine catalytique C-terminal, la Csk possède une région régulatrice N-terminale contenant les domaines SH3 et SH2, cependant, le rôle de cette région n'est pas bien connu (354). Cette région régulatrice serait importante pour optimiser l'activité kinase du domaine catalytique, mais ne jouerait pas un rôle spécifique dans la reconnaissance du substrat (354).

Pour résumer, des études structurales ont montré que 2 éléments différents régulent l'activité kinase (355). Le premier consiste en un groupe de sites de phosphorylation dans la boucle activatrice qui peut, soit directement ou indirectement, réguler le site actif (355, 356). Le second comprend une multitude de liaisons intramoléculaires entre le domaine kinase et les domaines SH3 et SH2 (357). Par ailleurs, une évidence récente suggère un mécanisme bidirectionnel de régulation par lequel les domaines de régulation inhibent Src et l'activité Src contrôle la disponibilité des domaines régulateurs. Par ce mécanisme, la famille Src peut être activée par des protéines qui phosphorylent ou qui changent la conformation du domaine catalytique. Une fois activée, la famille Src devient moins susceptible à la régulation, impliquant une rétroaction positive (positive feedback loop) sur leur activité (358).

Afin d'évaluer la contribution de Src dans l'augmentation de la synthèse protéique induite par l'Ang II *in vivo*, nous avons évalué l'effet-dose du PP2 (inhibiteur sélectif de la famille de tyrosine kinases Src) dans nos conditions expérimentales. Il est connu que le PP2 produit une inhibition puissante et sélective des kinases de la famille Src, telles que la p56^{lck} et la p59^{fynT} en empêchant la phosphorylation en Tyr sur Src (121).

3.2.2 Objectif

Notre objectif était de déterminer l'implication potentielle de Src dans notre modèle d'hypertrophie vasculaire aigu, c'est-à-dire dans l'augmentation de la synthèse protéique induite par l'Ang II *in vivo*.

3.2.3 Méthodes et groupes expérimentaux

Pour ce faire, nous avons suivi exactement le même protocole expérimental, et la même échelle temporelle que celle schématisée à la figure 2.1 du chapitre 2. L'administration du PP2 chez les rats mâles Sprague-Dawley a été effectuée une heure avant la perfusion de leucine- ^3H . Les rats traités à l'Ang II ont reçu le PP2 (ou son véhicule, le CMC 0,2 %) sous forme de bolus i.v. à la dose de 0,1 ou 0,5 mg/kg ($n = 4/\text{groupe}$), à raison de 0.3 ml/rat. Un autre groupe a reçu le PP2 seul, à la dose maximale de 0,5 mg/kg.

La préparation du PP2 a impliqué d'abord sa mise en suspension dans le carboxyméthylcellulose à 0,2% (CMC) à une concentration de 1mg/ml, puis passée aux ultrasons. Les aliquots préparés ont ensuite été congelés. Juste avant son administration, le PP2 a été dilué dans le CMC (0,2%), puis passé aux ultrasons. Les rats traités à l'Ang II ($n = 9$) ont reçu la même dose d'Ang II que dans les expériences précédentes, alors que les rats témoins ($n = 7$) n'ont reçu que le véhicule (CMC 0,2%). D'autre part, la pression artérielle a été mesurée de façon continue chez les rats éveillés, soit 15 minutes avant, ainsi qu'après l'administration du PP2 (incluant pendant la perfusion de leucine). La mesure de la synthèse protéique a été effectuée en suivant exactement la même méthode décrite au chapitre 2 (voir figure 2.3).

3.2.4 Résultats

L'Ang II a provoqué une augmentation significative de l'incorporation de leucine- ^3H , supérieure à 50% dans l'aorte (de 293 ± 28 du groupe témoin à 504 ± 56 cpm/mg) et dans les petites artères mésentériques (de 410 ± 31 à 739 ± 85 cpm/mg protéines (prot.)). L'administration d'Ang II n'a pas eu d'effet significatif sur la pression artérielle moyenne (PAM).

Lorsqu'administré à la dose de 0,5 mg/kg, le PP2 a provoqué une inhibition de la synthèse protéique induite par l'Ang II d'environ 75% dans l'aorte (344 ± 32 vs 504 ± 56 cpm/mg prot. du groupe Ang II) et d'environ 60% dans les petites artères mésentériques (539 ± 67 vs 739 ± 85 cpm/mg prot. du groupe Ang II) ($n=4$ et $n=3$ respectivement). Chez les rats traités à l'Ang II, le PP2 a diminué le taux de synthèse protéique au niveau des valeurs obtenues avec le PP2 administré seul. Contrairement

à la dose de 0.5 mg/kg, la dose plus faible de 0.1 mg/kg de PP2 (aorte: n=4; mésentère: n=2), ainsi que le PP2 seul à la dose maximale de 0.5 mg/kg (n=3) n'ont pas eu d'effet significatif sur la synthèse protéique (figures 3.5 et 3.6). De plus, un traitement au PP2 n'a pas affecté la PAM de façon significative aux deux doses utilisées.

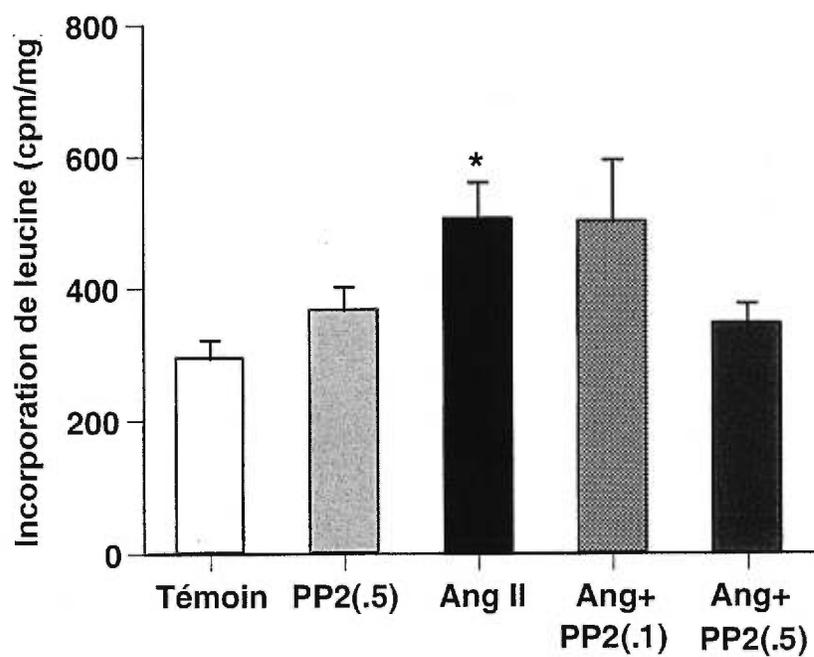


Figure 3.5 : Effets du PP2, un inhibiteur sélectif des tyrosine kinases Src, sur la synthèse protéique induite par l'Ang II au niveau de l'aorte (0.1 mg/kg, n=4; 0.5 mg/kg, n=4).
* P < 0.05 vs témoin.

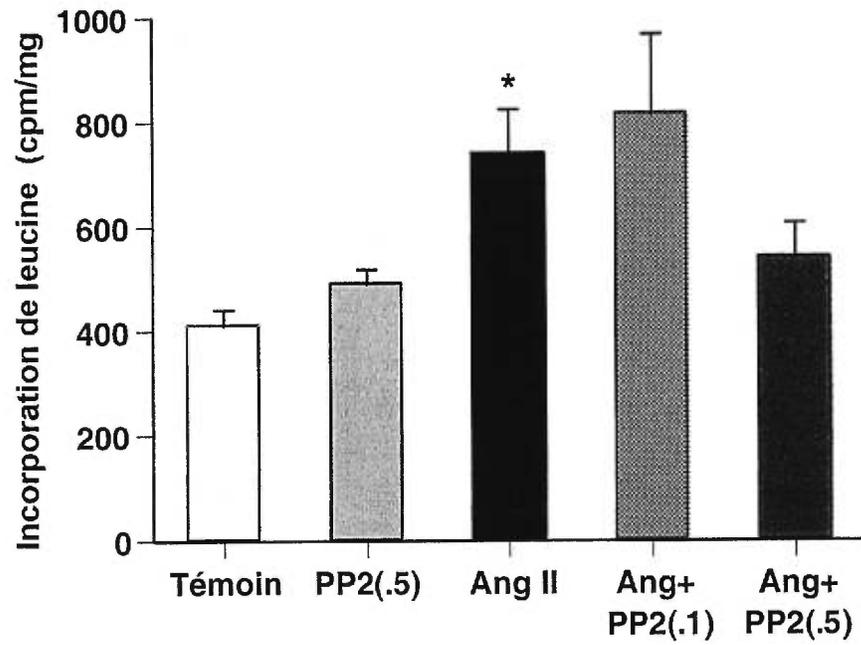


Figure 3.6 : Effets du PP2 sur la synthèse protéique induite par l'Ang II au niveau du mésentère (0.1 mg/kg, n=2; 0.5 mg/kg, n=3). * P < 0.05 vs témoin.

3.2.4 Discussion

Les résultats de cette étude supportent l'hypothèse que les tyrosine kinases de la famille Src sont d'importants régulateurs des voies de signalisation de l'Ang II. En effet, nos résultats démontrent clairement que l'activation de Src est nécessaire pour l'action stimulante de l'Ang II sur la synthèse protéique *in vivo* dans les tissus étudiés, indépendamment des changements de la pression artérielle. Cependant, le mécanisme par lequel le récepteur AT₁ viendrait activer Src n'est pas encore connu à ce jour, et serait matière à de futures études. Nous prévoyons étudier les cascades de signalisation qui sont affectées par le PP2 avant de publier ces résultats.

Selon le schéma d'activation proposé à la figure 1.5 de la section 1.4, les voies ERK-1/2 et P70^{S6K} seraient influencées par Src. Par contre, puisque le PD98059 n'a pas été très efficace pour diminuer la synthèse protéique des petites artères mésentériques, il semble que l'efficacité du PP2 soit attribuable à l'inhibition de la voie P70^{S6K}, du moins dans ces vaisseaux.

Pour conclure, la famille des tyrosine kinases Src représenterait donc une cible thérapeutique potentiellement importante afin d'atténuer le remodelage hypertrophique dans les tissus cardiovasculaires lors de conditions pathologiques impliquant le SRA.

3.3 L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE

3.3.1 Introduction

L'hypertrophie cardiaque est l'une des causes majeures de complications au niveau du cœur, telles que l'insuffisance cardiaque (359), l'infarctus du myocarde et les arythmies cardiaques (267). De plus, cette réponse résulte fréquemment de l'hypertension. Pour ces raisons, il est primordial de connaître l'implication des voies de signalisation de l'Ang II dans l'hypertrophie cardiaque.

Certains chercheurs ont montré que l'Ang II (de même qu'un étirement mécanique) activent plusieurs systèmes intracellulaires de seconds messagers via les récepteurs AT₁, tels que les phospholipases C, D et A₂, les tyrosine kinases, la p^{21ras}, les MAPKs, les RSKs, la PKC ainsi que des facteurs transcriptionnels dans les myocytes cardiaques de rats néonataux (*in vitro*) (360) ainsi que dans les fibroblastes (361). De plus, il semble que l'activation de la P70^{S6K} serait impliquée dans l'augmentation de la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les myocytes cardiaques (79). Une augmentation du taux global de synthèse protéique ainsi que les changements phénotypiques spécifiques lors de l'hypertrophie cardiaque seraient donc régulés par des mécanismes distincts (79). Une autre étude récente montre que dans les cœurs hypertrophiés de rats adultes, une inhibition des récepteurs AT₂ cardiaques (qui sont surexprimés suite à une hypertrophie chronique ventriculaire gauche) amplifie la réponse de croissance du ventricule gauche en réponse à l'Ang II. Ce phénomène serait dû à une augmentation de l'activation de la PKC induite par l'Ang II, ainsi qu'à et la suppression de la signalisation du GMPc (362). Tel que démontré par nos résultats antérieurs (sections 3.1.4 et 3.2.3), l'activation des voies de signalisation impliquées dans la synthèse protéique induite par l'Ang II ont un effet important dans l'aorte et le mésentère.

3.3.2 Objectif

En se basant sur ces résultats, nous avons pour objectif de déterminer leur importance au niveau du cœur, en utilisant notre modèle d'hypertrophie vasculaire *in vivo* (augmentation de la synthèse protéique) induite par l'Ang II. En sachant que

l'hypertrophie cardiaque a été décelée *in vivo* chez les rats traités à l'Ang II (234), il était important de connaître l'implication *in vivo* des voies de signalisation reliées à la synthèse protéique induite par l'Ang II dans nos conditions expérimentales.

3.3.3 Méthodes et groupes expérimentaux

Ces résultats ont été obtenus chez les mêmes animaux utilisés pour mesurer la synthèse protéique vasculaire après un traitement aux divers antagonistes des voies étudiées (sections 3.1 et 3.2). Le ventricule gauche du coeur a été isolé, puis traité selon le même protocole expérimental que décrit au chapitre 2 (section 2.2).

3.3.4 Résultats

L'administration d'Ang II a provoqué dans le ventricule gauche, tout comme dans l'aorte et le mésentère, une augmentation significative de la synthèse protéique par rapport au groupe témoin (figure 3.7). Nos résultats ont montré que l'administration du PD98059 à la dose maximale de 10 mg/kg (n=6) chez les rats traités à l'Ang II a provoqué une inhibition complète (100%) du taux d'incorporation de leucine. De plus, chez les rats ayant reçu une dose maximale de rapamycine (1 mg/kg; n=4) et de PP2 (0.5 mg/kg; n=4), nous avons remarqué une inhibition quasi-complète de la synthèse protéique après stimulation à l'Ang II. Par ailleurs, l'administration de l'irbésartan (2 X 10 mg/kg; n=11) chez les rats traités à l'Ang II a provoqué une diminution accrue de la synthèse protéique par rapport au groupe témoin (inhibition >100%).

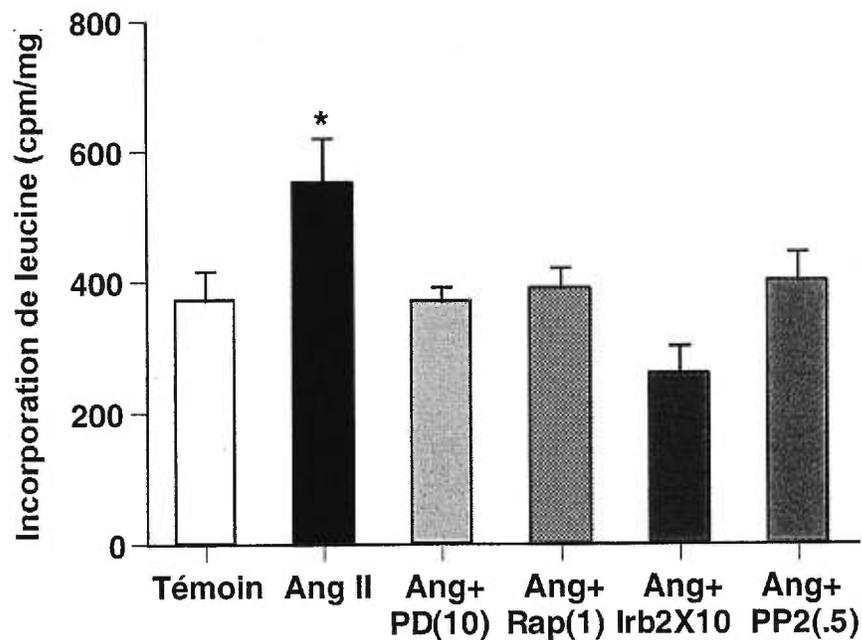


Figure 3.7: Effets de divers agents pharmacologiques (doses maximales) sur la synthèse protéique induite par l'Ang II dans le ventricule gauche (PD98059; 10 mg/kg, n=6; rapamycine; 1 mg/kg, n=4; irbésartan; 2 X 10 mg/kg, n=11). * P < 0.05 vs témoin.

3.3.5 Discussion

Les résultats de cette étude montrent un rôle important des voies de signalisation étudiées dans l'hypertrophie cardiaque. Les divers agents pharmacologiques ont provoqué une inhibition presque maximale de la synthèse protéique induite par l'Ang II. Aussi, la réponse de l'irbésartan au niveau cardiaque est semblable à celle précédemment obtenue dans l'aorte et le méésentère (voir section 3.1.4).

Il est difficile d'affirmer qu'une voie de signalisation soit plus importante qu'une autre, étant donné que les résultats sont relativement semblables avec le PD98059 et la rapamycine. Il semble que lorsqu'une voie est inhibée, la seconde n'est pas suffisante. Nos résultats suggèrent que les deux voies (ERK-1/2 et P70^{S6K}) pourraient collaborer (cross-talk) au développement de l'hypertrophie cardiaque. Les résultats avec le PP2 supportent l'importance de c-Src dans l'hypertrophie cardiaque dépendante de l'Ang II.

Des études plus approfondies devront être effectuées concernant les voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque *in vivo*, étant donné qu'il s'agit d'un phénomène important dans les maladies cardiovasculaires. L'élaboration de traitements plus efficaces visant à atténuer l'hypertrophie cardiaque chez les patients hypertendus permettrait d'empêcher le développement de certaines complications qui pourraient s'ensuivre (ACV, arrêts cardiaques, etc).

CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette étude effectuée chez un modèle animal *in vivo* vient confirmer les résultats d'études antérieures réalisées sur des modèles cellulaires, montrant que l'Ang II exerce une action trophique vasculaire dans le système cardiovasculaire (80, 227, 231, 237). En effet, cette étude représente la première démonstration d'une augmentation de la synthèse protéique dans la paroi vasculaire résultant de l'administration continue d'Ang II par voie intraveineuse. Aussi, nous démontrons que cet effet de l'administration exogène d'Ang II (400 ng/kg/min pendant 26h) est indépendant des changements de la pression artérielle, un phénomène qui avait été montré indirectement par le passé par l'utilisation d'agents antihypertenseurs (231, 236, 237).

Le rat représentait l'espèce animale de choix étant donné que la réponse trophique de l'Ang II avait déjà été démontrée dans des études chroniques (231, 236, 237). De plus, notre approche utilisant le rat éveillé nous permet d'apporter une nouvelle dimension à nos conclusions, beaucoup plus près des conditions physiologiques et/ou pathophysiologiques, représentant ainsi une intégration plus globale que celle offerte par des études *in vitro*. En fait, notre modèle expérimental permet d'étudier les processus de signalisation cellulaires *in vivo*, en tenant compte de l'intégration des influences hémodynamiques, hormonales et locales.

Les objectifs de cette étude ont été atteints. Tout d'abord, nous avons mis au point une méthode permettant de déterminer la synthèse protéique induite par l'Ang II dans les petits et gros vaisseaux ainsi que dans le ventricule gauche *in vivo*, nous permettant d'obtenir un indice précoce de remodelage hypertrophique. Avec cette méthode, nous avons pu répondre au second objectif proposé, soit d'évaluer la contribution des récepteurs AT₁ et des voies ERK-1/2 et P70^{S6K} dans l'hypertrophie cellulaire induite par l'Ang II dans les artères mésentériques et l'aorte *in vivo* en utilisant divers agents pharmacologiques (irbésartan, PD98059 et rapamycine). Selon différentes études réalisées *in vitro*, ces agents sont efficaces pour bloquer la synthèse protéique. Tel est le cas du PD98059 qui inhibe la phosphorylation et l'activation de ERK-1/2 par MEK-1/2 (81, 163, 164). Nos résultats avec le PD98059 confirment le rôle important de la voie ERK-1/2 des MAPK dans l'augmentation de la synthèse protéique induite par l'Ang II dans l'aorte et le ventricule gauche. Par contre, la

contribution de ERK-1/2 dans la réponse au niveau des petites artères mésentériques ne semble pas aussi importante. Nos résultats suggèrent donc une certaine hétérogénéité quant à l'implication de la voie ERK 1/2 des MAP kinases dans la synthèse protéique cardiovasculaire induite par l'Ang II (i.e. son rôle serait restreint à l'aorte et au ventricule gauche). Par ailleurs, la rapamycine, un autre composé qui inhibe la synthèse protéique dans les CMLV induite par l'Ang II (80, 206), produit, dans nos conditions expérimentales, une inhibition importante de la synthèse protéique induite par l'Ang II dans tous les territoires vasculaires étudiés.

Le troisième objectif, qui consistait à déterminer le rôle potentiel de Src dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II dans le mésentère et l'aorte, a également été réalisé. C'est avec le PP2, un inhibiteur sélectif de la famille des tyrosine kinases Src, que nous avons observé des résultats similaires à ceux obtenus avec la rapamycine. En effet, la synthèse protéique induite par l'Ang II a été diminuée par cet agent dans les 3 territoires étudiés, confirmant un rôle important de Src dans l'hypertrophie vasculaire induite par l'Ang II.

Finalement, le quatrième objectif consistait à déterminer l'implication des voies de signalisation étudiées au niveau du ventricule gauche du cœur. Nos résultats démontrent clairement que les éléments de signalisation ERK-1/2, P70^{S6K} et Src jouent un rôle important dans l'hypertrophie cardiaque, tel que démontré par les réponses obtenues avec le PD98059, la rapamycine et le PP2 aux doses maximales. De plus, la réponse à l'irbésartan au niveau cardiaque démontre l'importance du rôle que joue le récepteur AT₁ (résultats semblables à ceux obtenus dans l'aorte et le mésentère voir section 3.1.4).

D'une part, nos résultats montrent que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs AT₁ (irbésartan) est beaucoup plus efficace pour diminuer le taux de synthèse protéique induite par l'Ang II. En effet, bien qu'un rôle des voies ERK-1/2, c-Src et P70^{S6K} a pu être mis en évidence, il semble que le fait de bloquer plus en amont dans la cascade d'événements, soit au niveau du récepteur AT₁, permette une inhibition beaucoup plus marquée (significative) de la synthèse protéique. En effet, un antagonisme au niveau du récepteur AT₁ provoque, de façon non-spécifique, une

cessation de l'activation d'une multitude d'effecteurs présents dans diverses voies de signalisation intracellulaires, bloquant ainsi plusieurs phénomènes physiologiques. Il se pourrait que cette réponse produite par l'irbésartan soit en partie causée par son effet hypotenseur (voir section 3.1.4), ce qui reste à être démontré. D'autre part, il semble qu'une inhibition précoce dans les cascades de signalisation, par exemple au niveau de c-Src, puisse produire un effet intéressant et plus marqué que l'inhibition d'un élément plus distal dans les cascades, tel qu'indiqué par nos résultats avec le PP2.

Les inhibiteurs utilisés dans cette étude ont été choisis en raison de leur efficacité et leur sélectivité, facteurs observés dans des études *in vitro* antérieures. Dans le cas du PD98059, il s'agit du seul inhibiteur sélectif de la voie ERK-1/2, et qui a fait ses preuves dans de nombreuses études *in vitro*. Pour sa part, la rapamycine est un agent immunosuppresseur qui inhibe l'activation d'un élément en amont de la P70^{S6K}, soit FRAP/mTOR. Le fait que la rapamycine bloque en amont de la P70^{S6K} permet de supposer que d'autres éléments ont pu contribuer à la réponse observée. De plus, le PP2, un inhibiteur relativement récent, a démontré une efficacité convainquante dans des études *in vitro*. Par exemple, certaines caractéristiques distinguent le PP2 des inhibiteurs tyrosine kinase identifiés auparavant. Sa combinaison de puissance et de sélectivité pour les membres de la famille Src est sans précédent (i.e. supérieure à la génistéine). Par ailleurs, notre choix d'un antagoniste AT₁ s'est arrêté sur l'irbésartan, en raison de sa puissance comme antagoniste au niveau du récepteur AT₁ et de sa durée d'action plus longue que celle du valsartan et du losartan, tel que montré par une étude effectuée chez des sujets normotendus (363). De plus, il s'agit d'un antagoniste possédant une très grande sélectivité pour le récepteur AT₁. Nous avons donc utilisé les outils les mieux caractérisés pour déterminer l'implication des voies de signalisation intracellulaires voulues.

Les doses utilisées dans notre étude proviennent d'expériences *in vitro* antérieures, nous servant d'indice grossier pour déterminer la dose à administrer *in vivo*. L'ajustement des doses a été fait de façon empirique en fonction de l'effet recherché. A la lumière de nos connaissances, il n'existe pas de preuve que ces inhibiteurs et/ou antagonistes demeurent sélectifs dans des conditions *in vivo*, aux

doses utilisées. Nous vérifions actuellement l'effet des doses utilisées sur l'activité des enzymes cibles pour confirmer leur efficacité *in vivo*.

Il apparaît logique de suggérer qu'une inhibition au niveau des voies de signalisation (soit en aval du récepteur AT₁) serait plus « spécifique » par rapport à une inhibition au niveau du récepteur, en ce qui concerne l'effet trophique de l'Ang II. En effet, la proximité des éléments des voies intracellulaires avec la machinerie traductionnelle pourrait produire une inhibition plus spécifique du taux de synthèse protéique, sans affecter d'autres fonctions cellulaires influencées par l'Ang II. Il faudrait toutefois démontrer qu'une voie de signalisation est impliquée dans un seul processus physiologique. À cet effet, la voie P70^{S6K} est potentiellement plus intéressante que la voie ERK-1/2, qui est impliquée dans de nombreuses réponses cellulaires.

De plus, dans le contexte de pathologies cardiovasculaires, plusieurs facteurs extracellulaires (SNS, SRA, endothéline, facteurs de croissance, etc.) peuvent emprunter des voies de signalisation communes, la cellule agissant donc à titre d'intégrateur des signaux extracellulaires. Dans ce contexte, le fait de bloquer une voie de signalisation avec un seul agent pourrait être plus efficace, puisqu'il serait possible de bloquer la convergence de tous les signaux externes vers un effet cellulaire commun. Bien que les résultats présentés dans ce mémoire apportent des éléments de réponse à cette hypothèse, le fait d'avoir utilisé un seul stimuli externe ne permet pas de connaître toute l'ampleur de la contribution d'une voie de signalisation dans un contexte pathologique. De futures études devront être effectuées afin de déterminer si nos résultats pourraient être reproduits avec d'autres stimuli externes ou dans un modèle expérimental d'hypertension rénovasculaire.

Pour conclure, nos résultats *in vivo* montrent qu'une perfusion continue de 26h d'Ang II à une dose non-pressive provoque une augmentation de la synthèse protéique, menant, à plus long terme, à l'hypertrophie cardiovasculaire. Nos observations *in vivo* sont en accord avec les résultats d'études *in vitro* antérieures, montrant que les éléments de signalisation ERK-1/2, c-Src et P70^{S6K} sont impliqués dans l'augmentation de la synthèse protéique. Par contre, nos résultats suggèrent un

certain degré d'hétérogénéité qui pourra possiblement être exploité ultérieurement afin de limiter les effets antihypertrophiques à certains endroits du territoire cardiovasculaire. À l'opposé, l'inhibition du récepteur AT₁ permet une plus grande efficacité, en autant que l'inhibition soit soutenue tout au long de l'administration d'Ang II.

En terminant, nous croyons que ce mémoire, qui résume nos études réalisées *in vivo*, apporte une meilleure connaissance des événements de signalisation qui sont impliqués dans l'hypertrophie des petites et grosses artères ainsi que du coeur en réponse à des niveaux élevés d'Ang II, tels que retrouvés dans certaines conditions pathologiques.

CHAPITRE 5: BIBLIOGRAPHIE

1. Tortora GJ and Grabowski SR. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Anjou, Qué.: HarperCollins Inc., 1994.
2. Tortora GJ and Grabowski SR. *Principles of Anatomy and Physiology*: HarperCollins Publishers Inc., 1996.
3. Lee RMKW, Garfield RE, Forrest JB, and Daniel E. Morphometric study of structural changes in the mesenteric blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Blood vessels* 20: 57-71, 1983.
4. Walmsley JG, Gore RW, Dacey RG, et al. Quantitative morphology of arterioles from the hamster cheek pouch related to mechanical analysis. *Microvascular Research* 24: 249-271, 1982.
5. Miller BG, Connors BA, Bohlen HG, and Evan AP. Cell and wall morphology of intestinal arterioles from 4- to 6- and 17- to 19-week old Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Dallas* 9: 59-68, 1987.
6. Guyton AC and Hall JE. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996.
7. Mohrman DE and Heller LJ. *Cardiovascular physiology*: McGraw-Hill, Inc., 1991.
8. Thyberg J. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *International Review of Cytology* 169: 183-265, 1996.
9. Tortora GJ and Anagnostakos NP. *Principes d'anatomie et de physiologie*. Montréal: Harper & Row Inc., 1988.
10. Mulvany MJ and Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiological Reviews* 70: 921-971, 1990.
11. Davis MJ, Ferrer PN, and Gore RW. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *American Journal of Physiology* 250: H291-H303, 1986.
12. Garnier M and Delamare V. *Dictionnaire des termes de médecine*. Paris: Éditions Maloine, 1995.
13. Dorland. *Dorland's illustrated medical dictionary*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994.
14. Lumbers ER. Angiotensin and aldosterone. *Regulatory Peptides* 80: 91-100, 1999.
15. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews* 45: 205-251, 1993.
16. Siragy HM and Carey RM. Hypertension: Kidney, sodium and the renin-angiotensin system. In: *Atlas of Heart Diseases*, edited by E. Braunwald. Philadelphia: Current Medicine, 1995, p. 3.1-3.16.
17. Reid JL. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and clinical profile of the active angiotensin II receptor antagonist. *Cardiologia* 40: 187, 1995.
18. Morton JJ, Beattie EC, Speirs A, and Gulliver F. Persistent hypertension following inhibition of nitric oxide formation in young Wistar rat: role of renin and vascular hypertrophy. *Journal of Hypertension* 11: 1083-1088, 1993.

19. Böhm SK, Grady EF, and Brunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-coupled receptors. *Biochemical Journal* 322: 1-18, 1997.
20. Re RN, Fallon JT, Dzau VJ, Quay S, and Haber E. Renin synthesis by canine aortic smooth muscle cells in culture. *Life Sciences* 30: 99-106, 1982.
21. Lilly LS, Pratt RE, Alexander RW et al. Renin expression by vascular endothelial cells in culture. *Circulation Research* 57: 312-318, 1985.
22. Mizuno K, Nakamura M et al. Local generation and release of Ang II in peripheral vascular tissue. *Hypertension* 11: 223-229, 1988.
23. Schalekamp MA. Second Bjorn Folkow Award Lecture. The renin-angiotensin system: new surprises ahead. *Journal of Hypertension Supplement* 9: S10-S17, 1991.
24. Unger T. ACE inhibition in the tissues. *Clinical and Physiological Biochemistry* 9: 89-93, 1992.
25. Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Archive in Internal Medicine* 153: 937-942, 1993.
26. Johnston CI and Risvanis J. Preclinical pharmacology of Angiotensin II receptor antagonists: Update and outstanding issues. *American Journal of Hypertension* 10: 306S-310S, 1997.
27. Juillerat L, Nussberger J, Menard J et al. Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition. *Hypertension* 16: 564-572, 1990.
28. Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *Journal of Hypertension* 11: 1155-1159, 1993.
29. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *American Journal of Hypertension* 9: 277-284, 1996.
30. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, and Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236, 1991.
31. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351: 230-233, 1991.
32. Macari D, Bottani S, Whitebread S, De Gasparo M, and Levens N. Renal actions of the selective angiotensin AT₂ receptor ligands CGP 42112 B and PD 123319 in the sodium-depleted rat. *European Journal of Pharmacology* 249: 85-93, 1993.
33. Chiu AT, McCall DE, Price WAJ, Wong PC, Carini DJ, Duncia JV, Wexler RR, Yoo SE, Johnson AL, and Timmermans PB. In vitro pharmacology of DuP 753. *American Journal of Hypertension* 4: 282S-287S, 1991.
34. Wong PC, Price WAJ, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, and Timmermans PB. In vivo pharmacology of DuP 753. *American Journal of Hypertension* 4: 288S-298S, 1991.
35. Ullian ME and Linas SL. Angiotensin II surface receptor coupling to inositol trisphosphate formation in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 265: 195-200, 1990.

36. Lassègue B, Alexander RW, and Clark M. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal* 292: 509-517, 1993.
37. Inagami T, Mizukoshi M, and Guo DF. Angiotensin II receptor: molecular cloning, functions and regulation. In: *Angiotensin receptors*, edited by J. M. Saavedra and P. B. M. W. M. Timmermans. New York: Plenum Press, 1994, p. 1-15.
38. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *Journal of Biological Chemistry* 268: 24539-24542, 1993.
39. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 268: 24543-24546, 1993.
40. Hahn AWA, Jonas U, Buehler FR, and Resink TJ. Identification of a fourth angiotensin AT1 receptor subtype in rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192: 1260-1265, 1993.
41. Curnow KM, Pascoe L and White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Molecular Endocrinology* 6: 1113-1118, 1992.
42. Furata H, Guo DF and Inagami T. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183: 8-13, 1992.
43. Desarnaud F, Marie J, Lombard C, Larguier R et al. Deglycosylation and fragmentation of purified rat liver angiotensin II receptor: Application to the mapping of hormone-binding domains. *Biochemical Journal* 289: 289-297, 1993.
44. Meister B, Lippoldt A, Bunnemann B et al. Cellular expression of angiotensin type-1 receptor mRNA in the kidney. *Kidney International* 44: 331-336, 1993.
45. Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, and Hiwada K. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188: 446-452, 1992.
46. Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, and Neil JD. Angiotensin II type-q receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183: 1090-1096, 1992a.
47. Kakar SS, Riel KK and Neill JD. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 185: 688-692, 1992b.
48. Oliverio MI, Best CF, Kim HS et al. Angiotensin II responses in AT1a receptor-deficient mice: a role for AT1r receptors in blood pressure regulation. *American Journal of Physiology* 272: F515-F520, 1997.
49. Zhuo J, Alcorn D, Harris PJ and Mendelsohn FAO. Localization and properties of angiotensin II receptors in rat kidney. *Kidney International* 44: S40-S46, 1993.
50. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 10663-10667, 1995.

51. Stoll M, Steckelings M, Bottari SP, Metzger R, and Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 95: 651-657, 1995.
52. Sechi LA, Griffin CA and Schambelan M. The cardiac renin-angiotensin system in STZ-induced diabetes. *Diabetes* 43: 1180-1184, 1994.
53. Wiemer G, Scholkens BA, Wagner A, Heitsch H and Linz W. The possible role of angiotensin II subtype AT₂ receptors in endothelial cells and ischemic rat hearts. *Journal of Hypertension* 11: 234-235, 1993.
54. Wu J, Edwards D and Berecek KH. Changes in renal angiotensin II receptors in spontaneously hypertensive rats by early treatment with the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril. *Hypertension (Dallas)* 23: 819-822, 1994.
55. Siragy HM and Carey RM. Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33: 1237-1242, 1999.
56. Nahmias C and Strosberg AD. The angiotensin AT-2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 223-225, 1995.
57. Tsuzuki S, Ichiki T, Nakakubo H et al. Molecular cloning and expression of the gene encoding human angiotensin II type 2 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200: 1449-1454, 1994.
58. Dzau VJ, Mukoyama M and Pratt RE. Molecular biology of angiotensin receptors: target for drug research? *Journal of Hypertension* 12: S1-S5, 1994.
59. Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, and Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 30: 1238-1246, 1997.
60. Keiser JA and Panek RL. Pharmacology of AT₂ receptors. In: *Angiotensin receptors*, edited by J. M. Saavedra and P. B. M. W. M. Timmermans. New York: Plenum Press, 1994, p. 135-149.
61. de Gasparo M, Whitebread S, Kalenga MK et al. Down regulation of the angiotensin II receptor subtype AT₂ in myometrium during pregnancy. *Regulatory Peptides* 53: 39-45, 1994.
62. Shanmugam S, Llorens-Cortes C et al. Expression of Ang II AT₂ receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *American Journal of Physiology* 268: F922-F930, 1995.
63. Viswanathan M and Saavedra JM. Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides* 13: 783-786, 1992.
64. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *American Journal of Physiology* 267: H844-H852, 1994.
65. Johnston CI. Angiotensin receptor antagonists: focus on losartan. *Lancet* 346: 1403-1407, 1995.
66. Wong PC, Price WA, Chiu AT et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP753, an orally active antihypertensive agent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 252: 719, 1990.

67. Ohtawa M, Takayama F et al. Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide Ang II receptor antagonist, in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology* 35: 290-297, 1993.
68. Müller P, Cohen T et al. Angiotensin II receptor blockade with single doses of valsartan in healthy, normotensive subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 47: 231-245, 1994.
69. Bernhart CP, Perreault BP, Ferrari YA et al. A new series of imidazolones - highly specific and potent nonpeptide AT1 angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 36: 3371, 1993.
70. Cazaubon C, Gougat J, Bousquet F, Guiraudou P, Gayraud R et al. Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT1 subtype angiotensin II receptor antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265: 826-834, 1993.
71. Brunner HR. The new angiotensin II receptor antagonist, Irbesartan: Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *American Journal of Hypertension* 10: S311-S317, 1997.
72. Lacour C, Canals F, Galindo G et al. Efficacy of SR47436 (BMS-186295), a non-peptide angiotensin AT1 receptor antagonist in hypertensive rat models. *European Journal of Pharmacology* 264: 307-316, 1994.
73. Pool JL, Guthrie RM, Littlejohn T et al. The antihypertensive effects of irbesartan in patients with mild-to-moderate hypertension (abstract). *American Journal of Hypertension* 9: A152, 1996.
74. Marino MR, Langenbacher KM, Raymond RH, Whigan D, and Ford NF. Pharmacokinetics and antihypertensive effects of irbesartan (an AII receptor antagonist) in subjects with hypertension (abstract). *Journal of Hypertension* 14: S348, 1996.
75. Gillis JC and Markham A. Irbesartan: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in management of hypertension. *Drugs* 54: 885-902, 1997.
76. Pouleur HG. Clinical overview of Irbesartan: A new angiotensin II receptor antagonist. *American Journal of Hypertension* 10: S318-S324, 1997.
77. de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ et al. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension (Dallas)* 25: 924-927, 1995.
78. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, and Samuel JL. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of Angiotensin II on the rat vascular structure. *Journal of Clinical Investigation* 98: 418-425, 1996.
79. Sadoshima J and Izumo S. Rapamycin selectively inhibits angiotensin II-induced increase in protein synthesis in cardiac myocytes in vitro. *Circulation Research* 77: 1040-1052, 1995.
80. Giasson E and Meloche S. Role of p70 S6 protein kinase in Angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 5225-5231, 1995.

81. Servant MJ, Giasson E and Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 271: 16047-16052, 1996.
82. Catt KJ, Sandberg K and Balla T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. In: *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*, edited by M. K. Raizada, M. I. Phillips and C. Summers. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993, p. 307-356.
83. Meloche S, Servant MJ, Leduc I and Pellerin J. Angiotensin II stimulates protein synthesis but not DNA synthesis in rat fibroblasts expressing the human AT1 receptor. *Biochemical Journal* : (sous presse), 1996.
84. Rhee SG and Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific PLC isozymes. *Journal of Biological Chemistry* 267: 12393-12396, 1992.
85. Cockcroft S and Thomas GMH. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochemical Journal* 288: 1-14, 1992.
86. Lee CH, Park D, Wu D, Rhee SG, and Simon MI. Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *Journal of Biological Chemistry* 267: 359-362, 1992.
87. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MAJ, and Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* 7: 447-451, 1985.
88. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165: 196-203, 1989.
89. Sandberg K, Ji H, Clark AJ et al. Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* 267: 9455-9458, 1992.
90. Hokin LE. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annual Review in Biochemistry* 54: 205, 1985.
91. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Annual Review of Biochemistry* 56: 59-193, 1987.
92. Griendling KK, Tsuda T, Berk BC, and Alexander RW. Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 14: S27-S33, 1989.
93. Hug H and Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochemical Journal* 291: 329-343, 1993.
94. Newton AC. Protein kinase C: structure, function and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 270: 28495-28498, 1995.
95. Steinberg SF, Goldberg M, and Rybin VO. Protein kinase C isoform diversity in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27: 141-153, 1995.
96. Harrington EO and Ware AO. Diversity of the protein kinase C gene family. Implication for cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine* 5: 193-199, 1995.
97. Cerione RA, Storiszewski C, Gierschik P et al. Mechanism of guanine nucleotide regulating protein-mediated inhibition of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* 261: 9514, 1986.

98. Katada T, Dinuma M and Ui M. Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *Journal of Biological Chemistry* 261: 5215, 1986.
99. Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K et al. Chimeric alpha2-beta2-adrenergic receptors: Delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science* 240: 1310, 1988.
100. Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, and Bernstein KE. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 269: 10935-10939, 1994.
101. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375: 247-250, 1995.
102. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Schieffer E, and Bernstein KE. Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits angiotensin II activation of phospholipase C-gamma1 in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 15734-15738, 1995b.
103. Mogami H and Kojima I. Stimulation of calcium entry is prerequisite for DNA synthesis induced by platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196: 650-658, 1993.
104. Ling BN, Matsunaga H, Ma H, and Eaton DC. Role of growth factors in mesangial cell ion channel regulation. *Kidney International* 48: 1158-1166, 1995.
105. Semenchuk LA and Di Salvo J. Receptor-activated increases in intracellular calcium and protein kinase phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 370: 127-130, 1995.
106. Gould EM, Rembold CM and Murphy RA. Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, reduces calcium mobilization in swine carotid media. *American Journal of Physiology* 268: C1425-C1429, 1995.
107. Di Salvo J, Nelson SR and Kaplan N. Protein tyrosine phosphorylation in smooth muscle: a potential coupling mechanism between receptor activation and intracellular calcium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 214: 285-301, 1997.
108. Homma Y, Sakamoto H, Tsunoda M, Aoki M et al. Evidence for involvement of phospholipase C-gamma2 in signal transduction of platelet derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Biochemical Journal* 290, 1993.
109. LaBelle EF and Polyak E. Phospholipase C beta 2 in vascular smooth muscle. *Journal of Cellular Physiology* 169: 358-363, 1996.
110. Van Der Geer P, Hunter T and Lindberg RA. Receptor protein tyrosine kinases and their signal transduction. *Annual Review in Cellular Biology* 10: 251-338, 1994.
111. Liao F, Shin HS and Rhee SG. In vitro tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1 and phospholipase C-gamma2 by src-family protein tyrosine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191: 1028-1033, 1993.
112. Schieffer B, Bernstein KE and Marrero MB. The role of tyrosine phosphorylation in angiotensin II mediated intracellular signaling and cell growth. *Journal of Molecular Medicine* 74: 85-91, 1996.

113. Paxton WG, Marrero MB, Klein JD et al. The angiotensin II AT-1 receptor is tyrosine and serine phosphorylated and can serve as a substrate for the src family of tyrosine kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200: 260-267, 1994.
114. Huckle WR, Prokop CA, Dy RC et al. Angiotensin II stimulates protein-tyrosine phosphorylation in a calcium-dependent manner. *Molecular and Cellular Biology* 10: 6290-6298, 1990.
115. Bolen JR, Rowley RB, Spana C, and Tsygankiv AY. The src family of tyrosine kinases in hematopoietic signal transduction. *FASEB Journal* 6: 3403-3409, 1992.
116. Erpel T and Courtneidge SA. Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Current Opinion in Cellular Biology* 7: 176-182, 1995.
117. Parsons JT and Parsons SJ. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signalling pathway. *Current Opinion in Cellular Biology* 9: 187-192, 1997.
118. Marrero MB, Schieffer B, Ma H, Bernstein KE, and Ling BN. Ang II-induced tyrosine phosphorylation stimulates phospholipase C-gamma1 and Cl channels in glomerular mesangial cells. *American Journal of Physiology* 270: C1834-C1842, 1996.
119. Dhar A and Shukla SD. Electrotransfection of pp60v-src monoclonal antibody inhibits activation of phospholipase C in platelets. A new mechanism for platelet-activating factor responses. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9123-9127, 1994.
120. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 262: 5592-5595, 1987.
121. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS et al. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 271: 695-701, 1996.
122. Igishi T and Gutkind JS. Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 5-10, 1998.
123. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663-675, 1991.
124. Whitmarsh AJ and Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of Molecular Medicine* 74: 589-607, 1996.
125. Kiefer F, Tibbles LA, Lassam N, Zanke B et al. Novel components of mammalian stress-activated protein kinase cascades. *Biochemical Society Transactions* 25: 491-498, 1997.
126. Wan Y, Kurosaki T and Huang X-Y. Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* 380: 541-544, 1996.
127. Ishida M, Ishida T, Thomas SM and Berk BC. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) by Angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 82: 7-12, 1998.

128. Linseman DA, Benjamin CW and Jones DA. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 12563-12568, 1995.
129. Touhara K, Hawes BE, van Biesen T, and Lefkowitz RJ. G protein beta gamma subunits stimulate phosphorylation of Shc adapter protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 9284-9287, 1995.
130. Luttrell LM, Hawes BE, van Bilsen T et al. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and G-beta-gamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 271: 19443-19450, 1996.
131. Buday L and Downward J. Epidermal growth factor regulated p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611-620, 1993.
132. Pronk GJ, de Vries-Smits AMM, Buday L et al. Involvement of Shc in insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21ras. *Molecular and Cellular Biology* 14: 1575-1581, 1994.
133. Leever SJ, Paterson HF and Marshall CJ. Requirement for ras in raf activation is overcome by targeting raf to the plasma membrane. *Nature* 369: 411-414, 1994.
134. Ishida Y, Kawahara Y, Tsuda T, and Yokoyama M. Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 310: 41-45, 1992.
135. Molloy CJ, Taylor DS and Weber H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 268: 7338-7345, 1993.
136. Crews CM, Alessandrini A and Erickson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480, 1992.
137. Kyriakis JM and Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18: 567-577, 1996b.
138. Hill CS and Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199-211, 1995.
139. Kyriakis JM, and Avruch J. Sounding the alarm: Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 271: 24313-24316, 1996a.
140. Morooka H, Bonventre JV, Pombo CM et al. 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. *Journal of Biological Chemistry* 270: 30084-30092, 1995.
141. Force T, Pombo CM, Avruch JA et al. Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circulation Research* 78: 947-953, 1996.
142. Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD et al. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *Journal of Biological Chemistry* 272: 19943-19950, 1997.
143. Force T and Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31: 152-161, 1998.

144. Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry* 273: 1839-1842, 1998.
145. Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends in Biochemical Sciences* 18: 273-275, 1993.
146. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, and Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrinological Reviews* 17: 698-714, 1996.
147. Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, and Yokoyama M. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultures vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 71: 620-630, 1992.
148. Duff JL, Berk BC and Corson MA. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 188: 257-264, 1992.
149. Tsuda T, Kawahara Y, Shii K, Koide M et al. Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* 285: 44-48, 1991.
150. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185, 1995.
151. Robinson MJ and Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cellular Biology* 9: 180-186, 1997.
152. Sturgill TW, Ray BL, Erikson E and Maller JL. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates protein S6 kinase II. *Nature* 334: 715-718, 1988.
153. Gille H, Sharrocks AD and Shaw PE. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358: 414-417, 1992.
154. Marais R, Wynne J and Treisman R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73: 381-393, 1993.
155. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM and Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 13: 305-314, 1989.
156. Duan-Fang L, Duff JL, Daum G, Pelech SL and Berk BC. Angiotensin II stimulates MAP kinase kinase kinase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 79: 1007-1014, 1996.
157. Liao DF, Monia B, Dean N and Berk BC. Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 6146-6150, 1997.
158. Brunn GJ, Fadden P, Haystead TAJ and Lawrence JCJ. The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antibodies to a region near its COOH terminus. *Journal of Biological Chemistry* 272: 32547-32550, 1997b.
159. Mendez R, Kollmorgen G, White MF and Rhoads RE. Requirement of protein kinase C-delta for stimulation of protein synthesis by insulin. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5184-5192, 1997.

160. Fletcher CM, McGuire AM, Gingras A-C, Li H et al. 4E binding proteins inhibit the translation factor of eIF4F without folded structure. *Biochemistry* 37: 9-15, 1998.
161. Sun H, Charles CH, Lau LF and Tonks NK. MKP-1 (3CH134), an early immediate gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75: 487-493, 1993.
162. Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B et al. Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovascular Research* 30: 511-517, 1995.
163. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, and Saltiel AR. PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270: 27489-27494, 1995.
164. Dudley DT, Pang L, Decker SJ et al. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7686-7689, 1995.
165. Watts SW, Florian JA, and Monroe KM. Dissociation of angiotensin II-stimulated activation of mitogen-activated protein kinase kinase from vascular contraction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 286: 1431-1438, 1998.
166. Daub H, Wallasch C, Lankenau A et al. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO Journal* 16: 7032-7044, 1997.
167. Fukunaga R and Hunter T. MNK1, a new MAP-kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO Journal* 16: 1921-1933, 1997.
168. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, and Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO Journal* 16: 1909-1920, 1997.
169. Flynn A and Proud G. Insulin-stimulated phosphorylation of initiation factor 4E is mediated by the MAP kinase pathway. *FEBS Letters* 389: 162-166, 1996a.
170. Morley SJ and McKendrick L. Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 17887-17893, 1997.
171. Sonenberg N. Regulation of translation and cell growth by eIF-4E. *Biochimie* 76: 839-846, 1994.
172. Flynn A and Proud CG. The role of eIF4 in cell proliferation. *Cancer Surv.* 27: 293-310, 1996b.
173. Joshi B, Cai AL, Keiper BD et al. Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Serine 209. *Journal of Biological Chemistry* 270: 14597-14603, 1995.
174. Flynn A and Proud CG. Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* 270: 21684-21688, 1995.
175. Minich WB, Balasta ML, Goss DJ and Rhoads RE. Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor

- eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 7668-7672, 1994.
176. Mathews MB, Sonenberg N and Hershey JWB. Origins and targets of translational control. In: *Translational Control*, edited by J. W. B. Hershey, M. B. Mathews and N. Sonenberg. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, p. 1-29.
 177. Rao GN, Griendling KK, Frederickson RM, Sonenberg N, and Alexander RW. Angiotensin II induced phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 269: 7180-7184, 1994.
 178. Pause A, Belsham GJ, Gingras A-C, Donze O et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371: 762-767, 1994.
 179. Haghghat A, Mader S, Pause A, and Sonenberg N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO Journal* 14: 5701-5709, 1995.
 180. Fadden P, Haystead TAJ, and Lawrence JC. Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-1, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272: 10240-10247, 1997.
 181. Fleurent M, Gingras A-C, Sonenberg N and Meloche S. Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4006-4012, 1997.
 182. Gingras A-C and Sonenberg N. Adenovirus infection inactivates the translational inhibitors 4E-BP1 and 4E-BP2. *Virology* 237: 182-186, 1997.
 183. Kleijn M, Scheper GC, Voorma HO, and Thomas AA. Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *European Journal of Biochemistry* 253: 531-544, 1998.
 184. Pyronnet S, Gingras A-C, Bouisson M, Kowalski-Chauvel A et al. Gastrin induces phosphorylation of eIF4E binding protein 1 and translation initiation of ornithine decarboxylase mRNA. *Oncogene* 16: 2219-2227, 1998.
 185. Lin T-A, Kong X, Saltiel AR, Blackshear PJ, and Lawrence JCJ. Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes: synthesis, degradation and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Journal of Biological Chemistry* 270: 18531-18538, 1995.
 186. von Manteuffel SR, Gingras A-C, Ming X-F, Sonenberg N, and Thomas G. 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 4076-4080, 1996.
 187. Vanhaesebroek B, Leever SJ, Panayotou G, and Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinase: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 267-272, 1997.
 188. Ui M, Okada T, Hazeki K, and Hazeki O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signaling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 303-307, 1995.

189. Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, and Sung CK. Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signalling: studies with inhibitor, LY294002. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 204: 446-452, 1994.
190. Yano H, Agatsuma T, Nakanishi S, Saitoh Y et al. Biochemical and pharmacological studies with KT7692 and LY294002 on the role of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc epsilon-mediated signal transduction. *Biochemical Journal* 312: 145-150, 1995.
191. Hawes BE, Luttrell LM, van Biesen T, and Lefkowitz RJ. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the Gbg-mediated mitogen activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 271: 12133-12136, 1996.
192. Lopez-Hasaca M, Crespo P, Pellici PG et al. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275: 394-397, 1997.
193. Gingras A-C, Kennedy SG, O'leary MA, Sonenberg N, and Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Development* 12: 502-513, 1998.
194. Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J et al. Control of p70S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 377: 441-446, 1995.
195. Keith CT and Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270: 50-51, 1995.
196. Hoekstra MF. Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family. *Current Opinion in Gene Development* 7: 170-175, 1997.
197. Thomas G and Hall MN. TOR signaling and control of cell growth. *Current Opinion in Cellular Biology* 9: 782-787, 1997.
198. Graves LM, Bornfeldt KE, Argast GM, Krebs EG et al. cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-1 in aortic smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7222-7226, 1995.
199. Proud CG and Denton RM. Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochemical Journal* 328: 329-341, 1997.
200. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA et al. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70s6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 1432-1437, 1998.
201. Wasowska B, Wieder KJ, Hancock WW et al. Cytokine and alloantibody networks in long-term cardiac allografts in rapamycin-treated sensitized rat recipients. *Transplantation Proceedings* 27: 423-426, 1995.
202. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, and Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69: 1227-1236, 1992.
203. Jeffries HJB, Reinhard C, Kozma SC, and Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the 'polypyrimidine tract' mRNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 4441-4445, 1994.

204. Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT et al. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26457-26463, 1997.
205. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM et al. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-1 by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277: 99-101, 1997a.
206. Proud CG. p70 S6 kinase: an enigma with variations. *TIBS* 21: 181-185, 1996.
207. Sonenberg N and Gingras A-C. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 268-275, 1998.
208. Ballou LM, Luther H and Thomas G. MAP2 kinase and 70K S6 kinase lie on distinct signalling pathways. *Nature* 349: 348-350, 1991.
209. von Manteuffel SR, Dennis PB, Pullen N, Gingras AC et al. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70(s6k). *Molecular and Cellular Biology* 17: 5426-5436, 1997.
210. Feuillan PP, Millan MA, and Aguilera G. Angiotensin II binding sites in the rat fetus: characterization of receptor subtypes and interaction with guanyl nucleotides. *Regulatory Peptides* 44: 159-169, 1993.
211. Kang J, Richards EM, Posner P, and Summers C. Modulation of the delayed rectifier K⁺ current in neurons by an angiotensin II type 2 receptor fragment. *American Journal of Physiology* 268: C278-C282, 1995.
212. Zhang J and Pratt RE. The AT₂ receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus. *Journal of Biological Chemistry* 271: 15026-15033, 1996.
213. Hayashida W, Horiuchi M, and Dzau TJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type 2 receptor: role in mediating signal transduction and cellular function. *Journal of Biological Chemistry* 271: 21985-21992, 1996.
214. Nahmias C, Cazaubon SM, Briand-Sutren MM et al. Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in NIE-115 neuroblastoma cells. *Biochemical Journal* 306: 87-92, 1995a.
215. Huang X, Richards E and Summers C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin type 2 receptors. *Journal of Biological Chemistry* 271: 15636-15641, 1996.
216. Bedecs K, Elbaz N, Sutren M et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochemical Journal* 325: 449-454, 1997.
217. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T et al. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272: 19022-19026, 1997.
218. Tsuzuki S, Eguchi S, and Inagami T. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT₂) receptor in R3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228: 825-830, 1996a.
219. Tsuzuki S, Matoba T, Eguchi S, and Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension* 28: 916-918, 1996b.

220. Yamada T, Horiuchi M, and Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 93: 156-160, 1996.
221. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A et al. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *Journal of Clinical Investigation* 101: 527-535, 1998.
222. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST et al. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *Journal of Biological Chemistry* 269: 4832-4838, 1994.
223. Horiuchi M, Akishita M, and Dzau VJ. Recent progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 33: 613-621, 1999.
224. Heymes C and Levy BI. Fonctions du récepteur AT-2 de l'Angiotensine II. *Thérapie* 53: 213-216, 1998.
225. Brooks DP and Ruffolo RRJ. Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. In: *Angiotensin II Receptors. Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology and Clinical Perspectives.*, edited by R. R. J. Ruffolo Boca Raton: CRC Press Inc., 1994.
226. Regoli D, D'Orleans-Juste P, Rouissi N, and Rhaleb NE. Vasoactive peptides and characterization of their receptors. *Regulatory Peptides* 45: 323-340, 1993.
227. Geisterfer AA, Peach MJ, and Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation Research* 62: 749-756, 1988.
228. Gibbons GH, Pratt RE, and Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *Journal of Clinical Investigation* 90: 456-461, 1992.
229. Schelling P, Fischer H, and Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *Journal of Hypertension* 9: 3-15, 1991.
230. Pratt RE and Dzau VJ. Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system. In: *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System*, edited by M. K. Raizada, M. I. Phillips and C. Sumners Boca Raton: CRC Press Inc., 1993, p. 471-483.
231. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-635, 1991.
232. Naftilan AJ, Gilliland GK, Eldridge CS, and Kraft AS. Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II. *Molecular and Cellular Biology* 10: 5536-5540, 1990.
233. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Ziegler A et al. A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation* 104: 815-823, 1999.
234. Metsärinne KP, Stoll M, Falkenhahn M et al. Inhibiting the effects of angiotensin on cardiovascular hypertrophy. In: *Angiotensin Receptors*, edited by J. M. Saavedra and P. B. M. W. M. Timmermans. New York: Plenum Press, 1994, p. 235-253.
235. Mulvany MJ. Resistance vessel growth and remodeling: cause or consequence in cardiovascular disease. *Journal of Human Hypertension* 9: 479-485, 1995.

236. Moreau P, d'Uscio LV, Takase S et al. Angiotensin II increases tissue endothelin and induced vascular hypertrophy in vivo: reversal by ETa-receptor antagonist. *Circulation* 96: 1593-1597, 1997.
237. Simon G and Csiky B. Effect of neonatal sympathectomy on the development of structural changes in angiotensin II-treated rats. *Journal of Hypertension* 16: 77-84, 1998.
238. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, and Dzau VJ. Cell cycle progression. New therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* 98: 82-89, 1998.
239. Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM et al. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and raf. *Science* 260: 315-319, 1993.
240. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* 268: 14553-14556, 1993.
241. Meloche S, Seuwen K, Pages G, and Pouyssegur J. Biphasic and synergistic activation of p44 mapk (erk1) by growth factors: conclusion between late phase activation and mitogenicity. *Molecular Endocrinology* 6: 845-854, 1992.
242. Kahan C, Seuwen K, Meloche S, and Pouyssegur J. Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 267: 11369-11375, 1992.
243. Pages G, Lenormand P, L'Allemain G et al. Mitogen-activated protein kinase p42 mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings in the National Academy of Sciences USA* 90: 8319-8323, 1993.
244. Chang JY, Sehgal SN, and Bansbach CC. FK506 and rapamycin: novel pharmacological probes of the immune response. *Trends in Pharmacological Sciences* 12: 218-223, 1991.
245. Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* 257: H1755-H1765, 1989.
246. Berk BC and Rao GN. Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. *Journal of Cellular Physiology* 154: 368-380, 1993.
247. Terada N, Patel HR, Takase K et al. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 11477-11481, 1994.
248. Turla MB, Thompson MM, Corjay MH, and Owens GK. Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation Research* 68: 288-299, 1991.
249. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608, 1989.
250. Kimball SR, Vary TC and Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annual Review in Physiology* 56: 321-348, 1994.
251. Naftilan AJ, Pratt RE, Eldridge CS et al. Angiotensin II induces c-fos expression in smooth muscle via transcriptional control. *Hypertension* 13: 706-711, 1989.
252. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77: 1-4, 1988.

253. Lindpaintner K and Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system: an appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circulation Research* 68: 905-921, 1991.
254. Iwai N, Shimoike H, and Kinoshita M. Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 92: 2690-2696, 1995.
255. Sechi LA, Griffin CA, Grady EF et al. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circulation Research* 71: 1482-1489, 1992.
256. Suzuki J, Matsubara H, Urakami M et al. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circulation Research* 73: 439-447, 1993.
257. Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T et al. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells: an in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* 267: 10551-10560, 1992.
258. Rozich JD, Barnes MA, Schmid PG et al. Load effects on gene expression during cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27: 485-499, 1995.
259. Sadoshima J and Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation Research* 73: 413-423, 1993.
260. Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T et al. Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts: evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circulation Research*. 76: 489-497, 1995.
261. Lambert C, Massillon Y, and Meloche S. Upregulation of cardiac angiotensin II AT1 receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circulation Research* 77: 11001-11007, 1995.
262. Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *American Journal of Cardiology* 80: L15-L25, 1997a.
263. Colucci WS and Braunwald E. Pathophysiology of heart failure. In: *Heart Disease*, edited by E. Braunwald. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997b, p. 394-420.
264. Kim SK, Ohta K, Hamaguchi A et al. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension* 25: 1252-1259, 1995.
265. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS et al. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effect on coronary resistance, contractility and relaxation. *Journal of Clinical Investigation* 86: 1913-1920, 1990.
266. Baker KM, Booz GW and Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annual Review of Physiology* 54: 227-241, 1992.
267. Levy D, Garrison RJ, Savage DD et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *New England Journal of Medicine* 322: 1561-1566, 1990.
268. Abraham G, Pogatsa-Murray G, Forster T et al. Effect of cilazapril in patients with essential hypertension: effect on cardiac hypertrophy. *Orv.Hetil.* 137: 1583-1586, 1996.

269. Rockman HA, Wachhorst SP, Mao L et al. Ang II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *American Journal of Physiology* 266: H2468-H2475, 1994.
270. Bruckschlegel G, Holmer SR et al. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension* 25: 250-259, 1995.
271. Childs TJ, Adams MA, and Mak AS. Regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats by enalapril and the expression of contractile proteins. *Hypertension* 16: 662-668, 1990.
272. Yamagishi H, Kim S, Nishikimi T et al. Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodeling in myocardial-infarcted rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 25: 1369-1380, 1993.
273. Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A et al. Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta1 expression. *Hypertension* 23: 587-592, 1994.
274. Schmieder RE, Martus P, and Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: a meta-analysis of randomized double-blind studies. *JAMA* 275: 1507-1513, 1996.
275. Griendling KK, Lassegue B, and Alexander RS. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36: 281-306, 1996.
276. Yang S-G, Saifeddine M, and Hollenberg MD. Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of epidermal growth factor-urogastrone and other agonists in gastric smooth muscle. *Canadian Journal of Physiological Pharmacology* 70: 85-93, 1992.
277. Hollenberg MD. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends in Pharmacological Sciences* 15: 108-114, 1994.
278. Touyz RM and Schiffrin EL. Angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell pH, contraction and growth via tyrosine kinase-dependent signaling pathways. *Hypertension* 30: 222-229, 1997.
279. Touyz RM, He G, Deng LY, and Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 99: 392-399, 1999.
280. Lichtenstein A, Brecher P, and Chobanian A. Effects of hypertension and its reversal on the size and DNA content of rat aortic smooth muscle cells. *Hypertension Dallas* 8: 1150-1154, 1986.
281. Owens GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Dallas* 9: 178-187, 1987.
282. Janiak P, Pillon A, Prost JF et al. Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension* 20: 737-745, 1992.
283. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S et al. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation* 95: 46-54, 1995.

284. Saward L and Zahradka P. The angiotensin type 2 receptor mediates RNA synthesis in A10 vascular smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28: 499-506, 1996.
285. Booz GW, Reiprish MJ, and Baker KM. AT2 receptor blockade augments angiotensin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 26: 547, 1995.
286. Booz GW and Baker KM. Role of type 1 and 2 angiotensin receptors in angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 28: 635-640, 1996.
287. Yamada T, Akishita M, Pollman M et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sciences* 63: 289-295, 1998.
288. Dimmerler S, Rippmann V, Weiland U et al. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. *Circulation Research* 81: 970-976, 1997.
289. Thompson GB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
290. Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *American Journal of Pathology* 147: 267-277, 1995.
291. Mallat Z, Ohan J, Leseche G, and Tedgui A. Colocalization of CPP-32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 96: 424-428, 1997.
292. Hamet P, Richard L, Dam TV et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26: 642-648, 1995.
293. Isner JM, Kearney M, Bortman S, and Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91: 2703-2711, 1995.
294. Cho A, Courtman DW, and Langille BL. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circulation Research* 76: 168-175, 1995.
295. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, and Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis-counterbalancing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circulation Research* 79: 748-756, 1996.
296. Diep QN, Li J-S and Schiffrin E. In vivo study of AT1 and AT2 angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension* 34: 617-624, 1999.
297. Cao Z, Dean R, Wu L et al. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension* 34: 408-414, 1999.
298. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C et al. Effects of blood pressure and exploratory behavior of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377: 748-750, 1995.
299. Munzenmaier DH and Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 27: 760-765, 1996.
300. Swales JD. Renin-angiotensin system in hypertension. *Pharmacology and Therapeutics* 7: 172-184, 1979.
301. Reid I. Renin-angiotensin system and body function. *Archives of Internal Medicine* 145: 1475-1479, 1985.

302. Haber E. Defining the physiologic and pathophysiologic roles of renin: the role of specific inhibitors. *American Journal of Kidney Diseases* 5: A14-A22, 1985.
303. Lüscher TF and Vanhoutte PM. *The endothelium: Modulator of cardiovascular function*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1990.
304. Falloon BJ and Heagerty AM. In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension* 24: 16-23, 1994.
305. Lee RMKW. Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 65: 1528-1535, 1987.
306. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ et al. Small artery structure in hypertension: Dual process of remodeling and growth. *Hypertension* 21: 391-397, 1993.
307. Rizzoni D, Porteri E, Castellano M et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. *Hypertension* 28: 785-790, 1996.
308. Schiffrin EL and Hayoz D. How to assess vascular remodeling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *Journal of Hypertension* 15: 571-584, 1997.
309. Yamazaki T, Komuro I, and Yazaki Y. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *American Journal of Cardiology* 83: H53-H57, 1999.
310. Campbell-Boswell M and Robertson AL. Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Experimental and Molecular Pathology* 35: 265-271, 1981.
311. Simon G and Altman S. Subpressor angiotensin II is a bifunctional growth factor of vascular muscle in rats. *Journal of Hypertension* 10: 1165-1171, 1992.
312. Simon G, Abraham G, and Cserep G. Pressor and subpressor angiotensin II administration: two experimental models of hypertension. *American Journal of Hypertension* 8: 645-650, 1995.
313. Kassler-Taub K, Littlejohn T, Elliott W et al. Comparative efficacy of two angiotensin II receptor antagonists, irbesartan and losartan in mild-to-moderate hypertension: Irbesartan/Losartan study investigators. *American Journal of Hypertension* 11: 445-453, 1998.
314. Andersson OK and Neldam S. The antihypertensive effect and tolerability of candesartan cilexetil, a new generation angiotensin II antagonist, in comparison with losartan. *Blood Pressure* 7: 53-59, 1998.
315. SOLVD, and Investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *New England Journal of Medicine* 327: 685-691, 1992.
316. AIRE, and investigators s. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet* 342: 821-828, 1993.
317. Gavras H and Gavras I. Cardioprotective potential of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Journal of Hypertension* 9: 385-392, 1991.
318. Gavras I, Manolis A, and Gavras H. Effects of ACE inhibition on the heart. *Journal of Human Hypertension* 9: 455-458, 1995.

319. Csikos T, Chung O, and Unger T. Receptors and their classifications: focus on angiotensin II and the AT₂ receptor. *Journal of Human Hypertension* 12: 311-318, 1998.
320. Liu Y-H, Yang X-P, Sharov VG et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 99: 1926-1935, 1997.
321. Urata H, Strobel F, and Ganten D. Widespread tissue distribution of human chymase. *Hypertension* 12: S17-S22, 1994.
322. Wolny A, Clozel JP, Rein J et al. Functional and biochemical analysis of angiotensin II forming pathways in the human heart. *Circulation Research* 80: 219-227, 1997.
323. Zhang X, Xie YW, Nasjletti A et al. ACE-inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation* 95: 176-182, 1997.
324. Hamroff G, Blaufarb I, Mancini D et al. Angiotensin II-receptor blockade further reduces afterload safely in patients maximally treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors for heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 30: 533-536, 1997.
325. Di Pasquale P, Bucca V, Scalzo S et al. Safety, tolerability, and neurohormonal changes of the combination captopril plus losartan in the early postinfarction period: a pilot study. *Cardiovascular Drugs and Therapeutics* 12: 211-216, 1998.
326. Laflamme AK and de Champlain J. Interactions des systèmes sympathique et rénine-angiotensine. *Thérapie* 53: 245-252, 1998.
327. Davis JO and Freeman RH. Mechanisms regulating renin release. *Physiological Reviews* 56: 1-56, 1976.
328. Fingerle J, Muller RM, Kuhn H et al. Mechanism of inhibition of neointimal formation by the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril. A study in balloon catheter-injured rat carotid arteries. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 15: 1945-1950, 1995.
329. Campbell DJ. Extrarenal renin and blood pressure regulation: an alternative viewpoint. *Hypertension* 2: 266-275, 1989.
330. Dzau VJ, Gibbons GH, and Pratt RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension* 18: II100-II105, 1991.
331. Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, and Drago R. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 15: 327-331, 1990.
332. Diet F, Pratt RE, Berry GJ et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94: 2756-2767, 1996.
333. Powell J, Clozel J, Muller R et al. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245: 186-188, 1989.
334. Laporte S and Escher E. Neointima formation after vascular injury is angiotensin II-mediated. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187: 1510-1516, 1991.

335. Prescott M, Webb R and Reidy MA. ACE inhibitors vs AII, AT1 receptor antagonists: effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *American Journal of Pathology* 139: 1291-1302, 1991.
336. Pan X, Nelken N, Colyvas N, and Rapp JH. Inhibition of injury-induced intimal hyperplasia by saralasin in rats. *Journal of Vascular Surgery* 15: 693-698, 1992.
337. Moreau P, Takase H, d'Uscio LV, and Lüscher TF. Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke* 29: 1031-1035, 1998.
338. Moreau P, Lamarche L, Laflamme A, Yamaguchi N, and de Champlain J. Chronic hyperinsulinemia and hypertension: the role of the sympathetic nervous system. *Journal of Hypertension* 13: 333-340, 1995.
339. McNulty PH, Young LH, and Barrett EJ. Response of the rat heart and skeletal muscle protein in vivo to insulin and amino acid infusion. *American Journal of Physiology* 264: E958-E965, 1993.
340. Fischer WR, Venkatakrishnan V, Fisher ES et al. The 3H-leucine tracer: its use in kinetic studies of plasma lipoproteins. *Metabolism* 46: 333-342, 1997.
341. Garlick PJ, Millward DJ, and Waterlow JC. Protein turnover in cardiac and skeletal muscle. *Journal of Physiology (Lond.)* 2: P101-P102, 1973.
342. Biggs RB and Booth FW. Protein synthesis rate is not suppressed in rat heart during senescence. *American Journal of Physiology* 258: H207-H211, 1990.
343. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Lewis Far A, and Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275, 1951.
344. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B et al. Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 77: 1053-1059, 1995.
345. Berk BC and Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: Role of tyrosine kinases. *Circulation Research* 80: 607-616, 1997.
346. Resh MD. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76: 411-413, 1994.
347. Nicholls A et al. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11: 281-296, 1991.
348. Amrein KE, Molnos J et al. Csk-mediated phosphorylation of substrates is regulated by substrate phosphorylation. *Farmacology* 53: 266-272, 1998.
349. Moarefi I, LaFevre-Bernt M, Sicheri F et al. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385: 650-653, 1997.
350. Sicheri F, Moarefi I, and Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385: 602-609, 1997.
351. Xu W, Harrison SC, and et Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595-601, 1997.
352. Klages S, Adam D, Class K et al. Ctk: a protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 2597-2601, 1994.

353. Superti-Furga G and Courtneidge SA. Regulation of the Src protein tyrosine kinase. *Bioessays* 4: 321-330, 1995.
354. Sun G and Buddle RJ. Mutations in the N-terminal regulatory region reduce the catalytic activation of Csk, but do not affect its recognition of Src. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 367: 167-172, 1999.
355. Johnson LN and O'Reilly M. Control by phosphorylation. *Current Opinion in Structural Biology* 6: 762-769, 1996.
356. Hubbard SR. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO Journal* 16: 5572-5581, 1997.
357. Jeffrey PD et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature*. 376: 313-320, 1995.
358. Gonfloni S, Weijland A et al. Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src. *Nat. Struct. Biol.* 7: 281-286, 2000.
359. Kannel WB. Epidemiology and prevention of cardiac failure: Framingham Study insights. *European Heart Journal* 8: 23-26, 1987.
360. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP et al. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes: the critical role of Ca²⁺-dependent signaling. *Circulation Research* 76: 1-15, 1995b.
361. Kim S and Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews* 52: 11-34, 2000.
362. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M et al. Angiotensin II type 2 receptor blockade amplifies the early signaling growth response to angiotensin II in hypertrophied hearts. *Circulation* 99: 22-25, 1999.
363. Mazzolai L, Maillard M, Rossat J et al. Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: a direct comparison of three AT1 receptor antagonists. *Hypertension* 33: 850-855, 1999.