

Université de Montréal

Étude de l'implication de MK2 dans la réponse vasculaire à l'endothéline-1

par
Albert Nguyen

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en biochimie

Août 2009

© Albert Nguyen, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'implication de MK2 dans la réponse vasculaire à l'endothéline-1

présenté par :

Albert Nguyen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Audrey Claing
Président-rapporteur

Dr Bruce Gordon Allen
Directeur de recherche

Dr Éric Thorin
Co-directeur de recherche

Dr Pedro D'Orléans-Juste
Membre du jury

Résumé

L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant agent vasoconstricteur dont la production est dérégulée dans plusieurs maladies inflammatoires où l'expression des cyclooxygénases-1/2 (COX-1/2) est augmentée. Puisqu'il est connu que la voie p38 MAPK est impliquée dans la régulation de l'ET-1 au niveau de l'ARNm, nous avons étudié le rôle de l'un de ses substrats, la kinase MK2 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ET-1 et des COX. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris MK2-déficientes (MK2^{-/-}) ainsi que des contrôles (MK2^{+/+}) issus de la même portée. Des paramètres de la fonction cardiaque ont été mesurés sous anesthésie à l'aide d'un cathéter Millar et la réactivité vasculaire de l'artère fémorale a été mesurée par myographe. L'expression de ET-1, COX-1 et COX-2 a été quantifiée dans la cellule endothéliale aortique (CE) par qPCR. En réponse à l'ET-1 (100 nM), l'expression de la préproET-1 dans les CE augmente en fonction du temps (p<0.05) : cette variation est accentuée chez les souris MK2^{-/-}. Bien que la pression artérielle soit similaire entre les souris MK2^{+/+} et MK2^{-/-}, l'inhibition de COX (indométacine, 1 µM) augmente (p<0.05) la contraction à l'ET-1 des vaisseaux isolés provenant de souris MK2^{+/+} mais pas des MK2^{-/-}. Ces données suggèrent un rôle de MK2 dans la réponse vasculaire à l'ET-1 et possiblement dans la signalisation post-récepteur de l'ET-1 en général.

Mots clés : Cyclooxygénase, endothéline-1, expression génique, inflammation, MK2

Abstract

Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor whose production is deregulated in many inflammatory related diseases in which the cyclooxygenase-1/2 (COX-1/2) is up-regulated. Since it is known that the p38 MAPK pathway regulates ET-1 expression at the mRNA level, we studied the implication of the downstream kinase MK2 in the post-transcriptional regulation of ET-1 and COX. To accomplish this, MK2-deficient mice (MK2^{-/-}) and their wild type littermate controls (MK2^{+/+}) were used. Cardiac function parameters were measured using a Millar catheter under anesthesia and isometric reactivity of the isolated femoral artery was measured subsequently using a wire myograph. Aortic endothelial cell (EC) ET-1, COX-1 and COX-2 expression was quantified by qPCR. In response to ET-1 (100 nM), EC expression of preproET-1 increased in a time-dependant manner (p<0.05): this change in mRNA was greater in MK2^{-/-} mice. Although arterial pressure was similar in MK2^{+/+} and MK2^{-/-} mice, inhibition of COX (indomethacin, 1 μM) increased (p<0.05) the contraction of isolated vessels to ET-1 from MK2^{+/+} but not MK2^{-/-} mice. These data suggest a role of MK2 in the vascular response to ET-1 and, possibly, ET-1 post-receptor signalling in general.

Key words: Cyclooxygenase, endothelin-1, inflammation, MK2, gene expression

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiv
1. Introduction	1
1.1 Physiologie vasculaire	1
1.1.1 Facteurs contractants endothéliaux (EDCF).....	2
1.1.1.1 Mécanisme d'action de ces EDCF	4
1.1.1.2 Thromboxane A ₂	4
1.1.1.3 Endothéline-1	5
1.1.1.4 Angiotensine II.....	5
1.1.2 Facteurs relaxants endothéliaux (EDRF).....	7
1.1.2.1 Monoxyde d'azote.....	9
1.1.2.2 Prostacycline	10
1.1.2.3 EDHF	11
1.1.3 Relaxations et contractions dépendantes de l'endothélium.....	12
1.2 Endothéline-1	12
1.2.1 Synthèse de l'ET-1	13
1.2.2 Récepteurs de l'ET-1	14
1.2.3 Fonction des récepteurs ET _A et ET _B	15
1.2.4 Le système endothéline comme cible thérapeutique	16
1.2.5 Régulation de la synthèse d'ET-1	17
1.3 Cyclooxygénases.....	18
1.3.1 Pathologies liées aux COX.....	20

1.3.2	Interactions entre COX et ET-1	22
1.4	Les voies MAPK.....	23
1.4.1	p38 MAPK/MK2	25
1.4.2	MK2 <i>In vivo</i>	26
1.5	Stabilité et ARNm.....	26
1.5.1	Régulation par p38/MK2	27
1.5.2	ARNm de la PPET-1	28
1.5.3	ARNm de la COX.....	30
2.	Rationnelle et objectifs de l'étude	31
3.	Matériels et Méthodes	33
3.1	Conditions expérimentales.....	33
3.2	Génotypage	33
3.3	Millar.....	35
3.4	Culture cellulaire.....	36
3.5	Traitements cellulaires	37
3.6	Immunobuvardage de type Western	38
3.7	RT-qPCR.....	40
3.8	Réactivité vasculaire	42
3.9	Analyses statistiques	44
4.	Résultats	45
4.1	Phénotype cardiovasculaire des souris MK2 ^{-/-}	45
4.2	Expression de PPET-1, COX-1 et COX-2 en réponse à ET-1.....	47
4.3	La régulation de l'ARNm dépendante de MK2	50
4.4	La synthèse et la stabilisation de l'ARNm de la PPET-1	51
4.5	Réponses contractiles à l'ET-1	53
4.6	La dilatation induite par ACh est conservée chez les MK2 ^{-/-}	55
5.	Discussion	58
5.1	Phénotype cardiovasculaire bénéfique chez les souris MK2 ^{-/-}	58
5.2	L'influence à court terme de l'ET-1 sur l'ARNm.....	60
5.2.1	La boucle de régulation de l'ET-1	60
5.2.2	ET-1 régule la forme constitutive de COX.....	62
5.3	MK2 dans la régulation génique induite par ET-1	64

5.4	L'ET-1 augmente la synthèse de l'ARNm de la PPET-1	66
5.5	Mécanismes de compensation : MK3 comme roue de secours	67
5.6	La réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 est accentuée par l'inhibition de la production de PGI ₂ et du NO	69
5.6.1	Les MK2 ^{-/-} sont insensibles à l'inhibition de COX et NOS.....	70
5.7	La vasodilatation NO-dépendante.....	71
6.	Conclusions	73
6.1	Faiblesses et approches alternatives.....	74
7.	Références	75

Liste des figures

Figure 1. La voie des facteurs contractants endothéliaux.....	3
Figure 2. La voie des facteurs relaxants endothéliaux.....	8
Figure 3. La maturation des endothélines.....	13
Figure 4. Le trafic intracellulaire des récepteurs à l'ET-1.....	14
Figure 5. Activation de la voie des COX et synthèse de prostanoides.....	19
Figure 6. Cascade signalétique des MAPK.....	24
Figure 7. Représentation de l'ARNm de la PPET-1.....	29
Figure 8. Gel de génotypage.....	35
Figure 9. Cellules endothéliales d'aorte de souris en culture.....	37
Figure 10. Paramètres de la fonction vasculaire ventriculaire mesurés par Millar.....	46
Figure 11. Impact de l'ET-1 et MK2 sur l'expression de la PPET-1, COX-1 et COX-2.....	49
Figure 12. L'induction de l'expression de PPET-1 est bloquée par l'actinomycine D.....	52
Figure 13. Réponses contractiles d'artères fémorales provenant de souris WT et KO à des concentrations croissantes d'ET-1.....	54
Figure 14. Courbes concentration-réponse d'artères fémorales provenant de souris WT ou de souris KO à l'ACh en présence ou non d'un inhibiteur de la NOS, le L-NNA à 100 µM.....	56

Liste des tableaux

Tableau I. Séquences des amorces spécifiques.....	41
--	----

Liste des abréviations

3'/5'-UTR: Région 3'/5' non-traduite (*3'/5'- Untranslated Region*)

5-HT: 5'-hydroxytryptamine

AA: Acide Arachidnique

ACh: Acétylcholine

Act D: Actinomycine D

ADNc: ADN (Acide désoxyribonucléique) complémentaire

ADP: Adénosine diphosphate

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

Ang II: Angiotensine II

ARE: *AU-rich element*

ARNm: ARN (Acide ribonucléique) messenger

AT_{1/2}: Récepteur à l'angiotensine de type 1/2

ATP: Adénosine triphosphate

AUF1: *ARE/poly(U)-binding/degradation factor*

BMK1: *big* MAPK

bpm: battements par minute

BRF1: *butyrate response factor 1*

CO: monoxyde de carbone

COL: cadre ouvert de lecture

COX-1/2: cyclooxygénase-1/2

CS: *calf serum*

DAG: diacyl glycérol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DRO: Dérivé réactif de l'oxygène

EC: Cellule endothéliale

ECA: Enzyme de conversion de l'angiotensine

ECE-1/2: Enzyme de conversion de l'endothéline de type 1/2

ECGF: *Endothelial Cell Growth Factors*

EDCF: Facteurs contractants endothéliaux (*Endothelium-Derived Contracting Factors*)

EDHF: Facteurs hyperpolarisants endothéliaux (*Endothelium-Derived Hyperpolarising Factors*)

EDRF: Facteurs relaxants endothéliaux (*Endothelium-Derived Relaxing Factors*)

EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EET: Acide époxyéicosatriénoïque

EGTA: Acide éthylène glycol-bis (β -aminoéthylether)-N,N,N',N'-tétraacétique

ERK-1/2: *extracellular signal-regulated kinase-1/2*

ET-1: Endothéline-1

ET_{A/B}: Récepteur à l'endothéline de type A/B

FBS: *Fetal Bovine Serum*

GAPDH: Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase

GMPc: Guanosine monophosphate cyclique

GTP: Guanosine triphosphate

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HRP: *Horseradish Peroxidase*

Hsp27 : *Heat shock protein 27*

IL-1/2/6: Interleukine-1/2/6

IP₃: Inositol trisphosphate

JNK1/2/3: *Jun amino-terminal kinase-1/2/3*

KO: *knock-out*

KRSP: *KH-type splicing regulatory protein*

L-Arg: L-Arginine

L-NNA: N ω -nitro-L-arginine

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*

MK2/3: *MAPK Activated Protein Kinase 2/3*

MLCK: *Myosin Light Chain Kinase*

mm Hg: milligramme de mercure

NO: Monoxyde d'azote

(e,i,n)NOS: (endothéliale, inductible, neuronale) NO synthase

NSAID: *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug*

PABP: *Poly(A)-Binding Protein*

PBS: Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Solution*)

PCR: Réaction polymérase en chaîne (*Polymerase chain reaction*)

PGH₂: Prostaglandine H₂

PGI₂: Prostacycline

PIP₂: Phosphatidylinositol

PKA: Protéine kinase A

PKC: Protéine kinase C

PKG: Protéine kinase G

PLC: Phospholipase C

PPET-1: Prépro-ET-1

PSS: Solution physiologique saline (*Physiological Salt Solution*)

RCS: *Rabbit Aorta Contracting Substance*

SDS: *Sodium dodécyl sulfate*

SRAA: Système-Rénine-Angiotensine-Aldostérone

TBST: Tampon Tris salin supplémenté de Tween (*Tris Buffered-Saline Tween*)

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*

TP: Récepteur thromboxane-prostanoïde

TTP: Tristetraproline

TxA₂: Thromboxane A₂

WT: Type sauvage (*Wild-type*)

UA: Unité Arbitraire

UV: Ultra-Violet

Remerciements

Je souhaiterais d'abord remercier mes deux directeurs de recherche, le Dr Éric Thorin et le Dr Bruce Allen.

Depuis mes débuts dans le laboratoire du Dr Thorin, j'ai acquis une maturité autant sur le plan scientifique que personnel. J'y suis toujours poussé à en connaître davantage et à regarder dans un contexte plus large. Par son savoir, sa passion et sa guidance, il participe activement à l'apprentissage de chacun de ses disciples et je me sens fort privilégié d'en faire partie.

Le Dr Allen a été d'un support exceptionnel. Avec ses connaissances et son esprit scientifique hors du commun, il est toujours disponible à répondre à mes interrogations et aider à dissoudre mes troubles.

Un énorme merci au Dre Nathalie Trescase-Thorin qui, par sa patience et sa grande générosité, a rendu mon cheminement cahoteux au cours de mon stage et ma maîtrise un peu plus douce. Son grand savoir et sa minutie font d'elle une personne indispensable dont le coup de pouce est toujours très appréciée. Après tout, c'est bien le rôle d'une maman de laboratoire!

Je remercie également tous les étudiants avec qui j'ai partagé ces dernières années au laboratoire, sans qui les expériences seraient beaucoup trop ardues et mes journées bien monotones :

À Nada Farhat, toujours prête à prêter une oreille alors qu'on la voit courir à gauche et à droite, sans cesse sollicitée d'une part et d'autre. J'ai beaucoup d'admiration et de respect pour elle. Par ses nombreuses années d'expérience dans le laboratoire, c'est une ressource inestimable et son intelligence n'a d'égal que son amour pour le café.

Merci à Guillaume Voghel, avec qui j'ai partagé mon premier projet de recherche. Il représente un modèle de persévérance et de détermination. Il a toujours su surmonter les obstacles dressés devant lui et foncer vers de nouveaux défis. Je porte fièrement le flambeau qu'il m'a passé.

Lorsque qu'elle me voit débordé, Annick Drouin est toujours prête à m'offrir son aide. Je l'apprécie pour sa gentillesse et sa maturité, elle me porte souvent conseil et répond à mes questions, même les plus anodines. Nous partageons également plusieurs intérêts communs qui alimentent nos discussions amicales.

Virginie Bolduc est une étudiante avec qui on peut échanger des idées, mais aussi des rires. Elle représente un modèle d'assiduité au travail et n'hésite jamais à partager ses connaissances.

Merci à François Leblond dont le sens de l'organisation en a fait rougir plus d'un, moi le premier. Sa générosité est sans bornes et son sourire contagieux.

À Nour El-Amine, le dernier arrivé et cadet du laboratoire, avec qui j'ai développé un sens de complicité et de camaraderie.

Merci également à Dharmesh Dingar et à Georges Vaniotis qui m'ont souvent apporté une aide technique. Nous avons aussi échangé à plusieurs reprises nos opinions scientifiques, ce qui a été pour moi très instructif.

Merci aux employés du Centre de Recherche de l'Institut, qui ont pu m'apporter une aide indispensable: Maya Mamarbachi pour ses connaissances en biologie moléculaire et sa sagesse, ainsi que Marc-Antoine Gillis pour ses expertises par rapport aux souris, notamment le Millar.

Je souhaite clore cette section avec des remerciements au président-rapporteur, Dre Audrey Claing et membre du jury, Dr Pedro D'Orléans-Juste qui ont généreusement accepté de réviser ce mémoire et m'accorder une place bien importante dans leur horaire chargé.

1. Introduction

Les mécanismes contrôlant la régulation du flux sanguin sont à la fois nombreux, complexes, mais surtout vitaux. Les vaisseaux sanguins possèdent l'habileté de coordonner toutes leurs cellules afin de se contracter et se dilater aux moments opportuns. L'endothéline-1 (ET-1) est l'un des principaux effecteurs pouvant initier la contractilité vasculaire ce qui fait de lui un sujet d'intérêt. Une fois le signal capté, les cellules du lit vasculaire déclenchent une multitude de cascades signalétiques et propagent la réponse cellulaire. La voie p38 MAPK est activée en présence d'ET-1 et permet l'activation de divers mécanismes cellulaires tels la régulation de l'expression génique. Nos travaux visent à étudier l'implication de MK2 dans la réponse vasculaire à l'ET-1.

1.1 Physiologie vasculaire

Les artères, veines et capillaires possèdent leurs propres caractéristiques physiologiques ; ils diffèrent notamment au niveau de la taille, de leur rigidité et de leur perméabilité. La circulation sanguine est soumise à un contrôle aigu et à long terme, afin d'assurer un équilibre entre le besoin de nutriments des tissus et le travail cardiaque. Cette régulation est en partie contrôlée par l'endothélium, une monocouche de cellules tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins, en contact avec le sang d'un côté et les muscles lisses de l'autre. Bien qu'elle fût longtemps considérée comme une simple barrière physique, cette

paroi cellulaire permet la régulation du tonus vasculaire *via* l'activation des récepteurs endothéliaux par les molécules de signalisation, la synthèse et la sécrétion de médiateurs vasoactifs et l'induction subséquente d'une relaxation ou d'une contraction des muscles lisses, en fonction du stimulus. La communication entre les cellules endothéliales et musculaires est possible grâce aux jonctions gap.

1.1.1 Facteurs contractants endothéliaux (EDCF)

Les différents agents vasoconstricteurs vont induire une augmentation de calcium dans la cellule musculaire lisse. Ces facteurs libérés par l'endothélium suite à un stimulus possèdent l'acronyme EDCF (*endothelium-derived contracting factor*) et regroupent notamment le thromboxane (TxA₂), l'endothéline-1 (ET-1), et l'angiotensine II (Ang II) (Fig. 1).

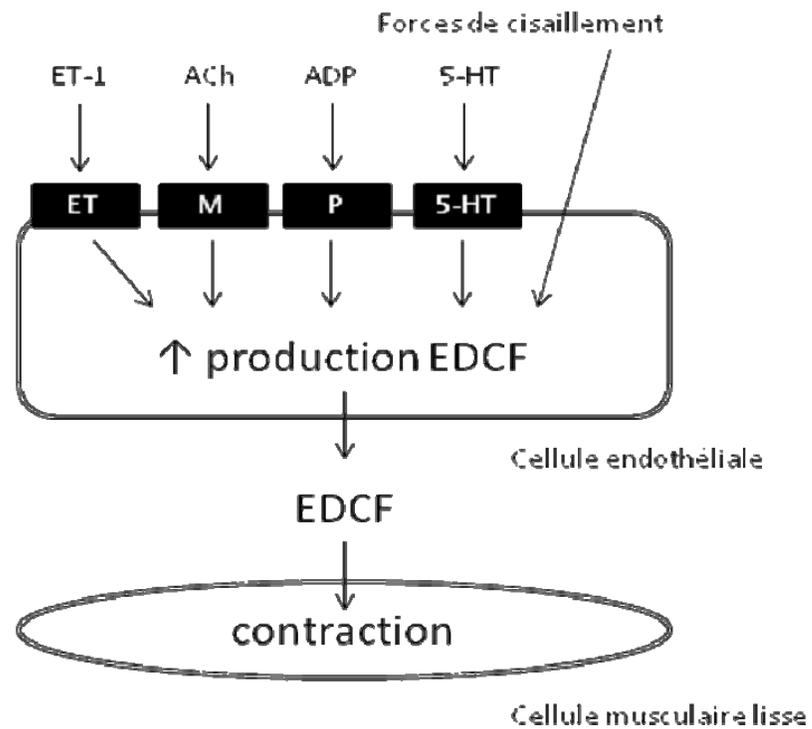


Figure 1. La voie des facteurs contractants endothéliaux. En présence de certains stimuli, la cellule endothéliale provoque la contraction du muscle lisse en sécrétant des EDCFs (adapté de (Vanhoutte *et al.* 2005)). 5-HT : 5'-hydroxytryptamine; ACh : acétylcholine; ADP : adénosine diphosphate; ET-1 : endothéline-1; M : récepteur muscarinique; P : récepteur purinergique.

1.1.1.1 Mécanisme d'action de ces EDCF

Bien qu'ils activent leur propre récepteur couplé à une protéine G, ces trois EDCF partagent des similarités au niveau de leurs mécanismes d'augmentation du calcium intracellulaire :

1. Activation de la phospholipase C (PLC) par G_q
2. Synthèse du diacyl glycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP_3) à partir du phosphatidylinositol (PIP_2) par la PLC
- 3a. IP_3 se lie sur son récepteur situé sur le réticulum sarcoplasmique, une réserve de calcium intracellulaire et y ouvre les canaux calciques permettant l'entrée de calcium dans le cytosol.
- 3b. DAG active la protéine kinase C (PKC) dépendante du calcium.
4. L'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} induit une dépolarisation de la membrane et donc une contraction des muscles lisses (Alberts *et al.* 2002).

1.1.1.2 Thromboxane A_2

Le TxA_2 est produit par la thromboxane synthase à partir de la prostaglandine H_2 (PGH_2 ou endoperoxyde) qui est elle-même synthétisée à partir de l'acide arachidonique (AA) par la cyclooxygénase (COX). À sa découverte en 1969 par Piper & Vane (Piper & Vane 1969), on lui attribue un effet fortement vasoconstricteur. Leur équipe avait caractérisé une substance instable contractile provenant d'aorte de lapin (RCS pour *rabbit aorta contracting*

substance). Le TxA₂ comme tel a été isolé et différencié des autres prostaglandines par le groupe du Dr Samuelsson (Hamberg *et al.* 1975). Le TxA₂ est un agoniste du récepteur thromboxane-prostanoïde (TP). Sa demi-vie de 30 secs fait de lui le plus instable des prostanoïdes (Gryglewski 2008). Outre son implication dans la vasoconstriction, le TxA₂ est impliqué dans l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus.

1.1.1.3 Endothéline-1

L'ET-1 est un peptide de 21 acides aminés possédant un effet vasoconstricteur très puissant, l'un des plus puissants connus (Yanagisawa *et al.* 1988). Sa biochimie et son mécanisme d'action seront davantage élaborés dans la section 1.2.

1.1.1.4 Angiotensine II

L'Ang II fait partie du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et possède aussi une forte capacité vasoconstrictrice. Ce système a été caractérisé avec la découverte de la rénine en 1898 par Tigerstedt et Bergman (Tigerstedt & Bergman 1898), et de l'angiotensine au milieu des années 1930 simultanément par Page et collaborateurs aux États-Unis et Menéndez et collaborateurs en Argentine, par qui ce peptide a été baptisé angiotonine et hypertensine, respectivement (Basso & Terragno 2001), (Skrbic & Igic 2009). Leurs travaux se sont basés sur les recherches du docteur Goldblatt qui a réussi

à induire une hypertension secondaire en clampant une artère rénale (Goldblatt *et al.* 1934). Ce n'est que depuis 1958 que l'angiotensine porte son nom suite à une entente entre les deux chercheurs (Braun-Menendez & Page 1958). Cette hormone de la classe des serpinines est libérée sous forme de précurseur principalement par le foie. Le premier précurseur est l'angiotensinogène, un peptide d'environ 450 acides aminés, qui est converti en angiotensine I (peptide de 10 résidus) par la rénine qui est sécrétée par les reins. L'angiotensine I, ne possédant d'autres rôles connus que celui de précurseur de l'Ang II, est ensuite clivée par une enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour obtenir l'Ang II avec ses 8 acides aminés. L'Ang II exerce son effet vasoactif sur deux principaux récepteurs couplés à une protéine G, le récepteur à l'AngII de type 1 (AT₁) et de type 2 (AT₂). Ainsi, le SRAA exerce un contrôle sur la pression sanguine en partie via l'Ang II et c'est pourquoi plusieurs drogues (inhibiteurs d'ECA) visent à contrer l'hypertension en diminuant la synthèse d'Ang II. L'aldostérone (une hormone minéralocorticoïde produite par les glandes corticosurrénales) fait également partie de ce système car sa production est stimulée par l'Ang II et l'augmentation du potassium sanguin. Elle régule la tension artérielle en réabsorbant le sodium urinaire et favorisant l'élimination du potassium dans les urines (Williams & Williams 2003).

1.1.2 Facteurs relaxants endothéliaux (EDRF)

L'endothélium permet aux vaisseaux de se dilater en sécrétant des molécules de signalisation appelées EDRF (*endothelium-derived relaxing factors*). Furchgott et Zawadzki furent les premiers à démontrer le rôle essentiel de l'endothélium dans la relaxation des vaisseaux (Furchgott & Zawadzki 1980). Les principaux médiateurs de la relaxation sécrétés par les cellules endothéliales sont le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂). Les autres substances de cette catégorie sont regroupées sous l'appellation EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factors*) (Fig. 2).

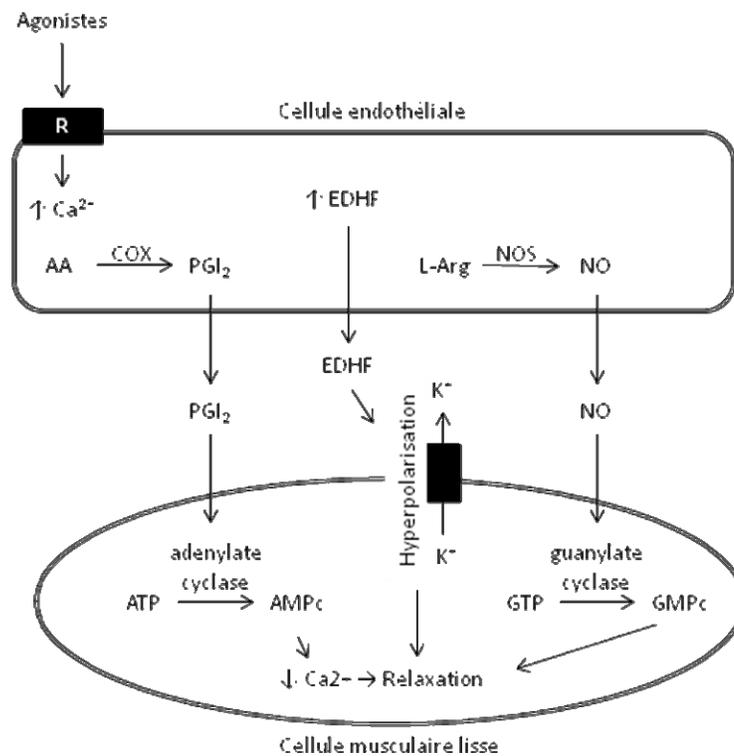


Figure 2. La voie des facteurs relaxants endothéliaux. Les EDRF sont classifiés en trois voies majeures : la PGI_2 , le NO et les EDHF (adapté de (Vanhoutte 2004)). AA: acide arachidonique; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; ATP : adénosine triphosphate; Ca^{2+} : ion calcium; COX : cyclooxygénase; EDHF : facteurs hyperpolarisants endothéliaux; GMPc : guanosine monophosphate cyclique; K^+ : ion potassium; L-Arg: L-arginine; NO : monoxyde d'azote; NOS : monoxy d'azote synthase; PGI_2 : prostacycline; R: récepteur.

1.1.2.1 Monoxyde d'azote

En effectuant des expériences de réactivité vasculaire sur des segments d'artères isolées, l'équipe du docteur Furchgott a démontré que l'ajout d'acétylcholine (ACh), via l'activation des récepteurs muscariniques, pouvait induire une relaxation des muscles lisses et ce, uniquement en présence d'un endothélium intact (Furchgott & Zawadzki 1980). Les études sur l'identification de cet EDRF libéré par les cellules endothéliales ont mené à un prix Nobel partagé entre trois chercheurs, Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad, qui ont contribué à la classification du NO parmi les EDRF (Vanhoutte 2009b). Ce gaz a la propriété de se diffuser rapidement entre les cellules et sa demi-vie de 5 à 10 secondes ne lui permet d'agir que localement. Le NO lie et active la guanylate cyclase, une enzyme qui convertit la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Outre son implication dans la transmission du signal visuel, ce médiateur joue un rôle important dans le relâchement des cellules musculaires en régulant l'ouverture de canaux ioniques et l'activation de la protéine kinase G (PKG). Les NO synthases (NOS) catalysent la formation du NO à partir de l'arginine (Alberts *et al.* 2002). Les différentes NOS sont regroupées par leur nomenclature selon leur localisation et fonction. La NOS endothéliale (eNOS ou NOSIII), qui est exprimée dans les cellules endothéliales, régule le tonus vasculaire; la NOS neuronale (nNOS ou NOSI) est retrouvée principalement dans les neurones où elle agit dans la transmission des signaux entre les neurones; la iNOS (NOSII)

est une forme inductible et son activité est insensible à la concentration du calcium intracellulaire contrairement aux deux précédentes qui sont constitutives et dépendantes du calcium (Mungrue *et al.* 2002).

1.1.2.2 Prostacycline

La prostacycline (PGI_2), alors nommée PGX, fut découverte par la technique *Vane Bioassay Cascade* qui avait permis de découvrir le TxA_2 (Gryglewski *et al.* 1976). La PGI_2 est synthétisée par la prostacycline synthase ($\text{PGI}_2\text{-S}$) à partir des mêmes précurseurs que le TxA_2 ce qui lui permet d'assurer le rôle de principal antagoniste physiologique du thromboxane. La PGI_2 exerce son effet vasodilatateur en activant, par sa liaison, le récepteur à la prostacycline (IP_1) (Smyth & FitzGerald 2002) qui est couplé à la protéine G_s . S'en suit l'activation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) puis l'activation de la protéine kinase A (PKA). Cette kinase cause la déphosphorylation de la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) ce qui empêche la phosphorylation des chaînes légères de myosine nécessaire à la contraction musculaire (Alberts *et al.* 2002). La PGI_2 antagonise les effets du TxA_2 , c'est un vasodilatateur en plus d'être un puissant agent antiplaquettaire. Ce prostanoloïde possède également une courte demi-vie (4 minutes à 37°C) (Gryglewski 2008).

1.1.2.3 EDHF

Les EDHF regroupent les autres médiateurs de la vasodilatation libérés par l'endothélium incluant le monoxyde de carbone (CO), le sulfure d'hydrogène (H₂S), l'acide époxyeicosatriénoïque (EET), les jonctions gap et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il peut donc s'agir de gaz, de peptides ou autres molécules provenant de divers mécanismes. La principale voie par laquelle la cellule endothéliale va induire une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses est par l'ouverture de canaux potassiques (Feletou & Vanhoutte 2009).

Il est maintenant bien connu que l'endothélium maintient un équilibre dynamique entre la relaxation et la contraction des vaisseaux. Le moindre déséquilibre peut mener à des pathologies vasculaires telles que l'hypertension et l'athérosclérose. Lorsque l'endothélium subit trop de dommages et ne répond plus correctement aux signaux de l'organisme, on parle de dysfonction endothéliale, un état précurseur des maladies cardiovasculaires. Ces dommages proviennent de radicaux libres libérés lors de multiples réactions cellulaires qui finissent par créer un stress oxydant sur les cellules endothéliales. Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) favorisent la constriction des vaisseaux en inhibant les voies de dilatation. Par exemple, plusieurs études ont confirmé l'importance du NO dans l'équilibre du tonus vasculaire, car si l'apport en NO était éliminé ou diminué, la balance tendait vers une augmentation de pression artérielle (Pepine 2009). Les DRO

séquestrent le NO et inhibent directement la guanylate cyclase (Rubanyi & Vanhoutte 1986). De plus, des études sur des souris transgéniques ont révélé qu'une déficience en eNOS entraîne une augmentation de la pression sanguine (Huang *et al.* 1995; Shesely *et al.* 1996; Labonte & D'Orleans-Juste 2004; Labonte *et al.* 2008).

1.1.3 Relaxations et contractions dépendantes de l'endothélium

Le contexte vasculaire est un facteur primordial dans la stimulation des voies de la relâche d'EDCF ou d'EDRF. Selon le type et le lit vasculaire et surtout selon le contexte physiologique ou pathologique, un même agoniste peut induire des réponses vasoactives différentes (selon la revue (Vanhoutte *et al.* 2005)). Prenons comme exemple l'ACh et l'ET-1. Bien que reconnus comme étant de puissants stimulants d'EDRF, ces facteurs déclenchent une réponse vasoconstrictrice dépendante de l'endothélium en favorisant la relâche d'EDCF en condition pathologique (ex : hypertension, diabète) lorsque la production de NO est altérée. Cette contraction semble être liée à l'activation des récepteurs TP par les endopéroxydes (Vanhoutte *et al.* 2005).

1.2 Endothéline-1

Des études au milieu des années 80 ont documenté l'existence d'une substance vasoconstrictrice produite par des cellules endothéliales en culture (Hickey *et al.* 1985; O'Brien *et al.* 1987). C'est en 1988 que l'endothéline (ET) fut

caractérisée pour la première fois comme étant un puissant vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales (Yanagisawa *et al.* 1988). Plus de vingt ans plus tard, cette définition s'est complexifiée : l'endothéline regroupe une famille de trois isoformes soit l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3 qui se différencient par leur puissance vasoconstrictrice ainsi que leur affinité pour le récepteur à l'endothéline de type A. La présente étude portera exclusivement sur l'ET-1.

1.2.1 Synthèse de l'ET-1

L'ET-1 est synthétisée suite à deux étapes de maturation par des protéases à partir d'un premier précurseur d'environ 200 acides aminés, la préproET-1 (PPET-1) qui est clivée par une protéase de type furine qui produit la bigET-1. Ce second précurseur de 41 résidus est à son tour clivé entre les résidus Trp-Val par une enzyme de conversion de l'endothéline, ECE-1/2, pour produire la forme active de 21 acides aminés du peptide, l'ET-1 (Fig. 3). La préproET-1 ne montre pas d'activité vasoconstrictrice alors que la bigET-1 est environ 140 fois moins puissante que l'ET-1 (Rubanyi & Polokoff 1994).

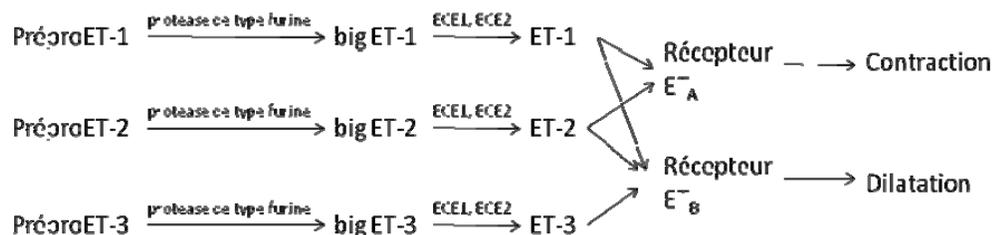


Figure 3. La maturation des endothélines. Clivage séquentiel des précurseurs des endothélines par les enzymes de type furase et de conversion. (adapté de (Kedzierski & Yanagisawa 2001)). ECE : enzyme de conversion de l'endothéline.

1.2.2 Récepteurs de l'ET-1

À ce jour, deux récepteurs à l'ET-1 ont été identifiés, clonés et séquencés : ET_A et ET_B (Arai *et al.* 1990; Sakurai *et al.* 1990) qui sont tous deux des récepteurs couplés à une protéine G. Bien qu'ils aient certaines similitudes, ces deux récepteurs possèdent des rôles cellulaires et mécanismes d'action bien distincts l'un de l'autre. Suite à une liaison à l'agoniste, les récepteurs à l'endothéline s'internalisent par la liaison de molécules d'arrestine et la formation de cages de clathrine. Toutefois, leur cheminement intracellulaire est différent. Alors qu'ET_A est recyclé à la surface par les transferrines, ET_B est dirigé vers les lysosomes et dégradé de manière constitutive avec ou sans ligand (Fig. 4). À l'extrémité C-terminale du récepteur où se lie l'arrestine, une séquence de sérines dicterait le processus de désensibilisation. En effet, une séquence riche en sérines est présente sur le récepteur ET_B et non sur ET_A (Bremnes *et al.* 2000). Ce motif permet une liaison plus stable des molécules d'arrestine, ce qui favoriserait une internalisation vers les lysosomes, alors qu'une interaction moins stable avec l'arrestine causerait plutôt un recyclage du récepteur (Oakley *et al.* 1999).

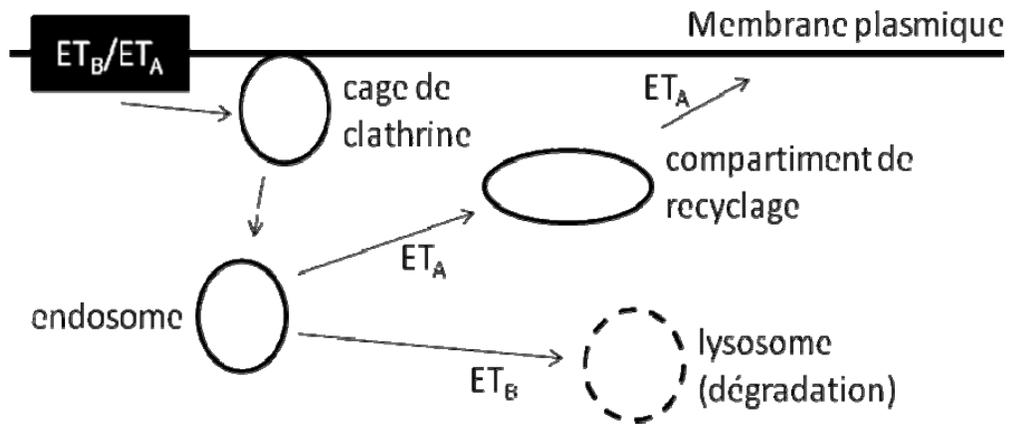


Figure 4. Le trafic intracellulaire des récepteurs à l'ET-1. L'internalisation de ET_A conduit à son recyclage alors que ET_B est dégradé (adapté de (Bremnes *et al.* 2000)).

1.2.3 Fonction des récepteurs ET_A et ET_B

L'ET-1 est retrouvée dans une vaste gamme de tissus (cœur, poumons, cerveau, reins), suggérant qu'elle est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques. Le récepteur de type A ne se retrouve pas sur les cellules endothéliales, mais plutôt sur les cellules musculaires lisses (Hunley & Kon 2001) où il y induit une contraction par le mécanisme précédemment élaboré (voir section 1.1.1.1). Ce récepteur active aussi la voie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) pour activer d'autres mécanismes cellulaires tels que la prolifération et la différenciation cellulaire (Cain *et al.* 2002; Barman & Marrero 2005).

Le récepteur de type B se retrouve aussi sur les muscles lisses où il induit la vasoconstriction suivant le même mécanisme qu'ET_A, mais il est aussi retrouvé sur l'endothélium vasculaire. Plusieurs travaux suggèrent que l'ET_B sur les cellules endothéliales induit une vasodilatation en favorisant la relâche de NO et de PGI₂ (Ortega Mateo & de Artinano 1997). Cette relaxation est cependant de courte durée tant *in vivo* qu'*in vitro* (Thorin *et al.* 2000). De plus, la distribution de l'ET_B et son mécanisme d'internalisation cellulaire attribuent un rôle de clairance de l'ET-1, c'est-à-dire qu'il serait chargé de diminuer les niveaux circulants d'ET-1 afin d'éviter une réponse prolongée au peptide (Fukuroda *et al.* 1994). En plus de ces rôles sur l'activité vasculaire, ET_B active aussi des voies MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et participerait ainsi à la régulation de l'expression de certains gènes (Xu *et al.* 2008).

1.2.4 Le système endothéline comme cible thérapeutique

Alors que la concentration normale d'ET-1 dans le plasma humain est d'environ 1,5 à 2 pg/mL, cette valeur est augmentée de plusieurs ordres de grandeur dans les cas d'infarctus du myocarde, d'angine de poitrine, d'urémie et de septicémie pour ne nommer que ceux-ci (Sokolovsky 1995). Doubler la concentration circulante d'ET-1 augmente la pression artérielle après un mois d'infusion chez le rat (Thorin *et al.* 1998a). L'hyper-endothélinémie limite les effets dilatateurs du NO (Gilbert *et al.* 2001; Migneault *et al.* 2005) et des

récepteurs β -adrénergiques (Gilbert & Thorin 2003; Okajima *et al.* 2004). Le système de l'ET-1 est une cible thérapeutique intéressante vu son implication dans plusieurs pathologies et notamment la maladie coronarienne (Thorin *et al.* 1999; Kinlay *et al.* 2001) et l'hypertension pulmonaire (Giaid *et al.* 1993). Pour citer quelques exemples cliniques, le Bosentan, un antagoniste double des récepteurs ET_A et ET_B, est utilisé avec succès dans le traitement de l'hypertension pulmonaire (Rubin *et al.* 2002; Rubin & Roux 2002; Davie *et al.* 2009). De plus, une étude démontre qu'un inhibiteur sélectif de l'ET_A, le Darusentan, apportait des effets bénéfiques sur des patients hypertendus en diminuant la pression diastolique (Nakov *et al.* 2002). L'enzyme de conversion de l'ET-1 serait aussi une cible intéressante pour contrôler la synthèse et les niveaux circulants d'ET-1 et ainsi limiter ses effets (Rufanova *et al.* 2009).

1.2.5 Régulation de la synthèse d'ET-1

Plusieurs stimuli hormonaux, physiques ou autres influencent la synthèse d'ET-1. Parmi les stimuli positifs on retrouve l'Ang II, la testostérone, les facteurs de croissance, la thrombine et le stress oxydatif (Boulanger & Luscher 1990; Hsu *et al.* 2004; Pearson *et al.* 2008; Syeda *et al.* 2008). En revanche, les forces de cisaillement (la force tangentielle imposée par le flux sanguin sur l'endothélium vasculaire), la PGI₂, la PGE₂ et le NO inhibent la production d'ET-1 (Boulanger & Luscher 1990; Kourembanas *et al.* 1993; Mitsutomi *et al.* 1999;

Miyauchi & Masaki 1999; Morawietz *et al.* 2000). De plus, l'ET-1 stimule la production de PGI₂ (de Nucci *et al.* 1988; Rebsamen *et al.* 2003) ce qui suggère que la prostacycline complète une boucle de régulation négative sur les effets de l'ET-1. Au sujet de l'autorégulation de l'ET-1, la littérature est divisée : certains affirment qu'il s'agit d'une autorégulation négative, que l'ET-1 réprime sa propre expression (Sanchez *et al.* 2002; Farhat *et al.* 2008) alors que d'autres observent que l'ET-1 stimule sa propre expression (Saijonmaa *et al.* 1992; Ito *et al.* 1993; Iwasaki *et al.* 1995; Saito *et al.* 1995; Yamakaw *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003). Cette divergence pourrait être expliquée par la différence dans les types cellulaires étudiés en plus de la variation dans les temps d'incubation et de prise de mesure entre les différents travaux.

1.3 Cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes responsables de la conversion de l'acide arachidonique en endopéroxydes. Bien que ces derniers puissent produire des effets vasoactifs via le récepteur TP, ils sont surtout considérés comme des intermédiaires qui seront convertis en différents prostanoides plus stables. Ceux-ci incluent la PGD₂, PGE₂, PGI₂, TxA₂ et PGF_{2α} et sont produits par leur propre synthèse (Fig. 5). La classification des COX en deux isoformes (COX-1 et COX-2) a débuté suite aux observations révélant qu'une forme de la COX se retrouvait majoritairement dans les plaquettes où elle produisait du thromboxane (COX-1) et une autre forme dans les cellules endothéliales où

était relâchée la prostacycline (COX-2). Une autre différence majeure est que COX-1 est constitutive alors que COX-2 est inducible. Ces deux enzymes assurent un équilibre dans la régulation du tonus vasculaire, de l'agrégation plaquettaire et la réponse inflammatoire puisque pour chacun des effets prothrombotiques et vasoconstricteurs du TxA_2 , la PGI_2 possède des effets inverses équipotents (Vanhoutte 2009a).

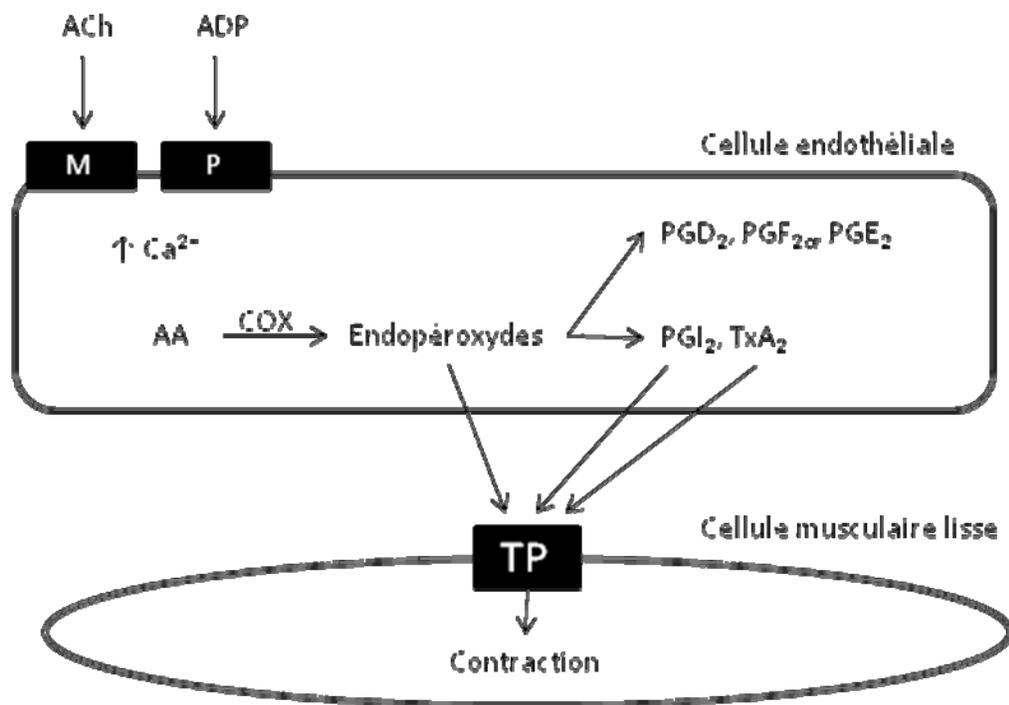


Figure 5. Activation de la voie des COX (adapté de (Vanhoutte 2009a)) et synthèse de prostanoides. AA : acide arachidonique; ACh : acétylcholine; ADP : adénosine diphosphate; Ca^{2+} : ion calcium; COX : cyclooxygénase; M : récepteur muscarinique; P : récepteur purinergique; TP : récepteur thromboxane-prostanoïde.

1.3.1 Pathologies reliées aux COX

Des études sur l'hypertension spontanée chez un modèle de rat ont démontré un lien existant entre cette pathologie et les COX. En effet, les rats hypertendus exprimaient davantage de COX-1 dans les cellules endothéliales alors que des observations similaires ont été rapportées chez des souris âgées non hypertendues. Ceci reflète, chez les animaux jeunes hypertendus, un vieillissement vasculaire prématuré accompagné d'une surexpression de COX-1 (Gendron *et al.* 2007; Tang & Vanhoutte 2008). Les prostanoides sécrétés par les COX induisent une vasoconstriction puisque la prostacycline produite n'induit plus de vasorelaxation dans les modèles de rats hypertendus et âgés mais est plutôt considéré comme un EDCF (Rapoport & Williams 1996). Dans ce modèle animal, cela semblerait dû à la perte d'expression des récepteurs IP relaxant. Chez l'homme, une mutation dysfonctionnelle des récepteurs à la prostacycline contribue au développement accéléré de dysfonction endothéliale et de maladies cardiovasculaires (Arehart *et al.* 2008; Vanhoutte 2009a). Les COX ont été associées au développement de l'athérosclérose vu leur implication dans divers mécanismes nécessaires au développement de cette pathologie (inflammation, agrégation des plaquettes, l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium, etc). La production de prostanoides par l'induction de COX-2 pourrait engendrer des mécanismes favorables à la formation de plaques athérosclérotiques. COX-2 est exprimé dans les lésions athérosclérotiques et si

son expression est réprimée, la taille de la lésion est réduite (Iniguez *et al.* 2008). Des inhibiteurs pharmacologiques non-spécifiques des COX existent sur le marché en tant qu'anti-inflammatoires (NSAID pour *non-steroidal anti-inflammatory drug*) tels que l'aspirine et l'ibuprofène, mais puisque COX-2 est induit dans la réponse inflammatoire, de nouvelles molécules ont été développées afin de viser spécifiquement COX-2 et ainsi éliminer les effets secondaires reliées à l'inhibition de COX-1 par les NSAIDs conventionnels (Iniguez *et al.* 2008). En clinique cependant, ces nouveaux médicaments, les coxibs, ont été associées à un risque plus élevé de développer de sérieux problèmes cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde et d'AVC (Mukherjee *et al.* 2001; Fosslien 2005). En effet, ces inhibiteurs pourraient être prothrombotiques en affectant l'équilibre entre la production de thromboxane et de prostacycline (Rao & Knaus 2008). Le Vioxx (rofecoxib) et le Bextra (valdecoxib) des compagnies Merck et Pfizer sont des exemples d'inhibiteurs spécifiques de COX-2 qui ont été retirés du marché. Des données de notre groupe montrent que la PGI₂ libérée par la COX-2 avec l'âge et en conditions pro-athérogéniques aurait un rôle protecteur vasculaire (Gendron *et al.* 2007). En condition saine, la PGI₂ produite dans les cellules endothéliales aurait un rôle bénéfique très bien caractérisé chez l'homme (Gryglewski 2008).

1.3.2 Interactions entre COX et ET-1

L'hypothèse que COX-2 soit exprimée pour balancer les effets de l'ET-1 est supportée par plusieurs groupes de recherches stipulant que l'ET-1 augmente l'expression de COX-2 (Gallois *et al.* 1998; Chen *et al.* 2003; Rebsamen *et al.* 2003; Peng *et al.* 2008). La plupart de ces études observent une variation dans l'expression de COX-2 mais pas de COX-1. Comme mentionné précédemment, la COX-2 est induite en réponse à des cytokines. L'ET-1 semble favoriser un phénotype inflammatoire en stimulant l'expression de COX-2 qui engendre une augmentation de PGI₂ et d'interleukin-8 (IL-8), une cytokine pro-inflammatoire (Peng *et al.* 2008). L'induction de l'expression de COX-2 par l'ET-1 serait dépendante de l'activation des voies ERK et p38 MAPK (Carli *et al.* 2009). L'interleukin-1 (IL-1) est une autre cytokine inflammatoire pouvant augmenter l'expression de COX-2 de manière MAPK-dépendante (Di Mari *et al.* 2007). L'ET-1 et COX-2 semblent donc agir en parallèle par le biais des voies MAPK. Une étude visant à reproduire le manque de biodisponibilité du NO associé à plusieurs états pathologiques a démontré un lien entre la COX-2 et la réponse à l'ET-1 (Zhou *et al.* 2006). En effet, chez des souris transgéniques déficientes en eNOS, la réponse contractile à l'ET-1 était accentuée alors que celle induite par un analogue du thromboxane (U-46619) demeurait inchangée. Cette variation dans la réponse vasculaire semblait liée à l'augmentation de l'expression de COX-2, car en présence d'un inhibiteur spécifique de COX-2, le celecoxib, cette variation était perdue (Zhou *et al.* 2006). Bref, il n'est pas clair si COX-2

est exprimée pour balancer les effets de l'ET-1 ou encore si elle agit en synergie afin d'amplifier la réponse. Il faut cependant prendre soin de bien différencier le contexte physiologique du contexte pathologique puisque ces interactions pourraient différer d'un contexte à l'autre.

1.4 Les voies MAPK

Les voies de signalisation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) répondent à divers stimuli tel le stress et les facteurs de croissance et régulent un vaste éventail de rôles cellulaires incluant la carcinogenèse, l'inflammation, l'expression génique, le développement, la sénescence et la différenciation, le cycle et la mort cellulaire (pour revue, voir (Ono & Han 2000; Kumar *et al.* 2003). Une fois déclenchées, ces cascades de signalisation sont modulées par diverses kinases activatrices ainsi que par des phosphatases inhibitrices. Les MAPK sont jusqu'à présent catégorisées en quatre groupes possédant chacun leur stimuli et rôles cellulaires respectifs : ERK1/2 (*extracellular signal-related kinases*), JNK1/2/3 (*Jun amino-terminal kinases*), ERK5 ou *big* MAPK (BMK1) et les kinases p38 α / β / γ / δ (Ono & Han 2000). Ces voies possèdent toutes la même structure de signalisation : une première kinase, la MAPKKK, est activée suite aux stimuli, cette kinase en active une autre par phosphorylation. Cette deuxième kinase est une MAPKK qui va à son tour activer la prochaine MAPK (Kumar *et al.* 2003). Suivent ensuite une multitude de substrats qui serviront de médiateurs dans la réponse cellulaire (Fig. 6). Bien

que ces voies soient bien distinctes, il existe une régulation croisée entre elles, c'est-à-dire que certains substrats sont communs à plus d'une voie et peuvent donc être activés par plus d'une kinase (Xiao *et al.* 2002).

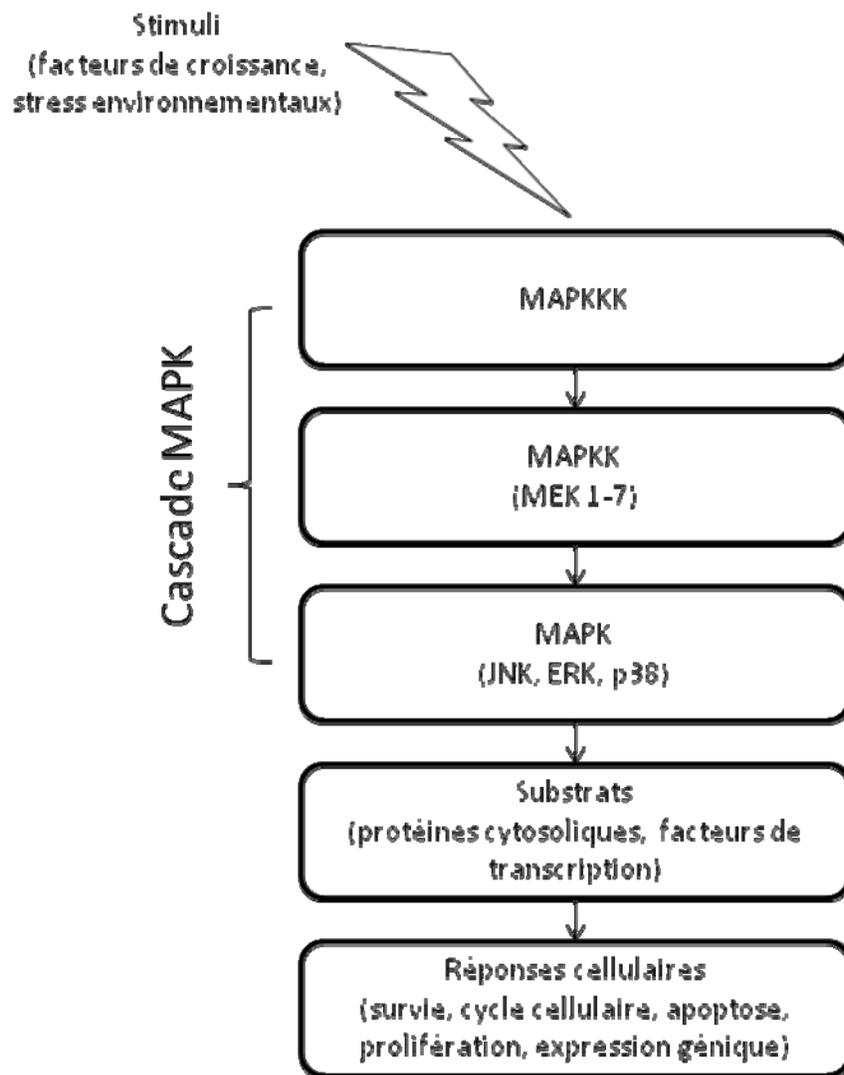


Figure 6. Cascade signalétique des MAPK (adapté de (Kumar *et al.* 2003)).

1.4.1 p38 MAPK/MK2

La présente étude porte principalement sur la voie des p38 MAPK. Cette voie peut être activée par les stress extracellulaires (endotoxines, choc thermique et osmotique, etc) (Han *et al.* 1994; Rouse *et al.* 1994), les cytokines inflammatoires (Freshney *et al.* 1994; Raingeaud *et al.* 1995) et les facteurs de croissance (Rousseau *et al.* 1997). Les quatre isoformes de p38 se différencient par leurs substrats et leur localisation tissulaire; bien que les formes α et β soient exprimées ubiquitairement, γ et δ sont limitées à certains tissus (Eckert *et al.* 2003). La majorité des études portant sur p38 MAPK sont axées vers p38 α/β puisque les deux autres isoformes ne sont pas affectés par l'inhibiteur pharmacologique de p38, le SB203580. Bien que les MAPKKs en amont de p38 soient nombreux, les deux MAPKKs principalement responsables de l'activation de p38 sont MKK3 et MKK6. En aval des p38 se trouve une grande diversité de substrats incluant des facteurs de transcriptions ainsi que d'autres protéines kinases. Ces dernières sont appelées MAPKAPK (ou MK). Par exemple, MK2 a d'abord été caractérisé en aval des MAPK (Stokoe *et al.* 1992) puis ensuite identifié comme étant le premier substrat de p38 (Freshney *et al.* 1994; Rouse *et al.* 1994). En effet, l'activation de MK2 est inhibée par SB203580 et non par PD98059, l'inhibiteur de la voie ERK1/2 (Cuenda *et al.* 1995; Cohen 1997). La structure du complexe MK2:p38 a été caractérisée par cristallographie (ter Haar *et al.* 2007; White *et al.* 2007) et il a été démontré que la liaison et l'activation subséquente de MK2 était nécessaire à la translocation

du complexe vers le cytoplasme (Ben-Levy 1998) où se retrouvent les substrats de MK2 tel que Hsp27 impliqué dans le remodelage des filaments d'actine (Kotlyarov & Gaestel 2002). Il est aussi suggéré que MK2, en formant un complexe avec p38, stabilise ce dernier, car en absence de MK2, les niveaux de p38 diminuent (Kotlyarov *et al.* 2002).

1.4.2 MK2 *In vivo*

MK2 est principalement reconnu pour son implication dans l'augmentation de cytokines inflammatoires, ce qui en fait un sujet d'étude intéressant sur les maladies liées à l'inflammation. En effet, en croisant un modèle de souris transgéniques déficientes en MK2 (MK2^{-/-}) avec d'autres modèles de maladies inflammatoires, plusieurs études ont rapporté une diminution du phénotype inflammatoire. Les souris MK2^{-/-} développeraient moins d'arthrite induite par le collagène (Hegen *et al.* 2006), moins d'athérosclérose lorsque hypercholestérolémiques (Jagavelu *et al.* 2007), seraient mieux protégées contre la neuroinflammation retrouvée dans la maladie d'Alzheimer (Culbert *et al.* 2006) et celle de Parkinson (Thomas *et al.* 2008) et seraient protégées des dommages liés à l'ischémie (Wang *et al.* 2002; Shiroto *et al.* 2005).

1.5 Stabilité et ARNm

Dans le processus d'expression d'un gène, de la synthèse d'un ARNm à la production d'un peptide, il existe plusieurs mécanismes de régulation

permettant à la cellule d'intervenir à différentes étapes clés. Des études de microarray ont révélé qu'en réponse à des signaux cellulaires, la stabilité de l'ARNm est responsable de 40% à 50% des changements d'expression génique (Garneau *et al.* 2007). C'est pourquoi plusieurs études ont porté sur l'étape post-transcriptionnelle dans la régulation des niveaux protéiques et ainsi, durant la dernière décennie, plusieurs mécanismes de stabilisation et de dégradation des ARN messagers ont été mis à jour. Les ARNm contiennent notamment à l'extrémité 5' une coiffe et 3' une queue polyadénylée (riche en adénines) essentiels à la stabilité (Ross 1995).

1.5.1 Régulation par p38/MK2

La voie p38 MAPK est une des voies activées dans le mécanisme de régulation des niveaux d'ARNm, notamment de cytokines (Winzen *et al.* 1999), en réponse à divers stress (Bollig *et al.* 2002). Dans ce contexte, le principal effecteur de cette voie est MK2. Cette dernière possède un rôle vastement documenté dans la régulation de la stabilité de plusieurs ARNm (Kotlyarov & Gaestel 2002). MK2 n'agit pas directement sur l'ARNm puisqu'elle ne possède pas de sites d'interaction lui permettant de s'y lier. En revanche, MK2 peut directement phosphoryler divers intermédiaires protéiques qui possèdent une affinité pour l'ARNm cible et pour la plupart, une affinité pour une région riche en adénines et uraciles (ARE pour *AU-rich element*) située dans la région 3' non-traduite responsable de la stabilité des ARNm. Pour citer un exemple bien

documenté, il a été reporté que lors d'une infection, le LPS induit une augmentation de la production de cytokines IL-2/6 et TNF- α . Ce changement serait dû à une augmentation de la stabilité de leur ARNm dépendante de l'activation de la voie p38 (Neininger *et al.* 2002; Ehltng *et al.* 2007; Su *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2008). MK2 phosphoryle la protéine déstabilisatrice tristetraproline (TTP) ce qui lui fait perdre son affinité pour la région ARE du messenger de TNF- α (Hitti *et al.* 2006). Il existe plusieurs protéines intermédiaires stabilisatrices (*Poly(A)-Binding Protein* (PABP) (Bernstein *et al.* 1989), HuR (Brennan & Steitz 2001)) et déstabilisatrices (Tristetraproline (TTP) (Hitti *et al.* 2006), *ARE/poly(U)-binding/degradation factor* (AUF1) (Brewer 1991; Loflin *et al.* 1999), *KH-type splicing regulatory protein* (KSRP) (Min *et al.* 1997; Chen *et al.* 2001), *butyrate response factor 1* (BRF1) (Maitra *et al.* 2008)) et plusieurs de celles-ci sont des substrats de MK2.

1.5.2 ARNm de la PPET-1

L'ARNm de la PPET-1 est très labile, sa demi-vie d'une vingtaine de minutes permet un équilibre très dynamique entre sa synthèse et sa dégradation. Une des voies de régulation de la production d'ET-1 est la stabilité de l'ARNm du précurseur de l'ET-1, la PPET-1. En effet, l'expression du messenger de PPET-1 varie en réponse à divers stimuli. Une des observations supportant ce mécanisme est la présence de deux éléments régulateurs, soit une région 5' non-traduite (5'-UTR) impliquée dans l'activité traductionnelle et une région 3'-

UTR, cette dernière occupant la moitié de l'ARNm et comprenant au moins deux domaines pouvant moduler la stabilité (Fig. 7). Une mutation de séquences précises dans cette dernière région engendre une augmentation de la stabilité et, par conséquent, de la quantité d'ARNm (Mawji *et al.* 2004; Reimunde *et al.* 2005). Des régions ARE seraient à l'origine de cette déstabilisation en agissant comme site de liaison pour protéines régulatrices de la stabilité de l'ARNm. Bien que plusieurs de ces protéines aient été identifiées, peu sont reconnues pour agir directement sur le messager de la PPET-1. AUF1 serait une de ces protéines et causerait la dégradation de l'ARNm par la voie ubiquitine-protéasome en interagissant avec sa cible via la région 3'-UTR (Mawji *et al.* 2004).



Figure 7. Représentation de l'ARNm de la PPET-1. Régions régulatrices de l'expression entourant la région codante. 3'-UTR : région 3' non-traduite; 5'-UTR : région 5' non-traduite; AAAAA : queue polyadénylée; COL : cadre ouvert de lecture (adapté de (Mawji *et al.* 2004)).

1.5.3 ARNm de la COX

La séquence de l'ARNm de la COX-2 possède 61% d'homologie avec celle de la COX-1. Une différence majeure entre ces deux ARNm se retrouve au niveau de la région 3'-UTR de la COX-2, ce qui explique la différence d'instabilité entre ces deux ARNm. En effet, on retrouve une plus grande région riche en AU chez ce messager (Hla & Neilson 1992; Appleby *et al.* 1994). La demi-vie de cet ARNm est de 2-3 h (Newton *et al.* 1997; Nieminen *et al.* 2008). La protéine stabilisatrice HuR possède une affinité pour la région 3'-UTR du messager de COX-2 et empêche ainsi la dégradation de cet ARNm (Dixon *et al.* 2001). TTP est une autre protéine pouvant lier la région 3'-UTR de COX-2, mais cette protéine est déstabilisatrice (Boutaud *et al.* 2003).

2. Rationnelle et objectifs de l'étude

L'ET-1 est un des principaux agents vasoconstricteurs sécrétés par l'endothélium vasculaire. Vu son puissant potentiel vasoactif, il est impliqué dans le maintien de la fonction vasculaire (Miyauchi & Masaki 1999), mais peut aussi être délétère lorsque mal régulé (Giaid *et al.* 1993; Ganz *et al.* 1996). L'endothélium vasculaire coordonne diverses réponses lorsque exposé à des substances vasomotrices telles que l'ET-1 (voir section 1.1.1). À faible dose, l'ET-1 produit des effets vasoconstricteurs puissants et de longue durée. Il est donc important d'étudier les divers mécanismes pouvant amplifier et transmettre cette réponse vasoconstrictrice et également les voies activées pour contrer cette réponse et permettre de retrouver l'équilibre.

Ainsi, notre étude vise d'une part, à caractériser dans les cellules endothéliales le mécanisme d'autorégulation de l'ET-1 et donc observer comment l'ET-1 peut réguler sa propre production. D'autre part, l'implication des COX sera étudiée puisque ces enzymes permettent la production de prostanoïdes vasoactifs en réponse à l'ET-1. Nous observerons leur expression génique puisque leur ARNm contient plusieurs domaines régulateurs de la production et de la stabilité du messager. Enfin, l'implication de la voie p38 MAPK/MK2 dans la transmission de la réponse à l'ET-1 sera aussi abordée, puisque cette

voie est activée par l'ET-1 en plus d'être connue pour réguler les niveaux d'ARNm en général.

Notre hypothèse de travail est que la présence d'ET-1 favorise l'expression de la PPET-1, afin de produire davantage d'ET-1 et de potentialiser sa réponse, tout en augmentant l'expression des COX. Cette réponse au niveau vasculaire serait influencée par la présence de MK2 de la voie p38 MAPK.

3. Matériels et Méthodes

3.1 Conditions expérimentales

Pour nous permettre d'étudier le rôle de MK2, de l'ET-1 et des COX, nous avons appliqué des protocoles et techniques utilisant des artères, des protéines et l'ARNm provenant de cellules endothéliales en culture et de divers tissus, le tout chez la souris mâle. Nous avons comparé deux groupes de souris, soit un modèle transgénique homozygote (MK2^{-/-}) et des souris contrôles de type sauvage (WT). Les souris ont été sacrifiées à l'âge de trois mois. Le modèle MK2^{-/-} nous a été fourni par le laboratoire du Dr Matthias Gaestel de Hannover, en Allemagne. Les souris sont élevées dans notre animalerie et génotypées par nos soins avant sacrifice.

3.2 Génotypage

Chaque souris a été individuellement génotypée afin de confirmer leur génotype en fonction du gène codant pour MK2. Un échantillon d'ADN a été obtenu en prélevant l'extrémité de la queue des souris. L'échantillon a d'abord été digéré par une incubation de 3h à 55°C dans un tampon de digestion fait de NaCl (150mM), Tris (50mM), EDTA (25mM), SDS (0.25%) et protéinase K (20 mg/mL) (Fermentas). Ensuite, le mélange a été centrifugé 10 mins à 12 500 rpm, à température pièce. Une fraction du surnageant contenant l'ADN a été diluée (1 :200), puis mélangée avec du chelex (Biorad). Une étape de

dénaturation de la protéinase K a été exécutée en chauffant les échantillons à 95°C durant 10 mins. 10 µL du mélange contenant l'ADN génomique (ADNg) ont été utilisés comme matrice pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par la réaction PCR suivante : 94°C 10 mins, (94°C 30 sec, 58°C 45 sec, 72°C 1 min) x40 cycles, 72°C 10 mins. L'ADNc a été synthétisé par la Taq polymérase (Fermentas) dans un mélange de 25 µL contenant : 10 µL d'ADNg, 2.5 µL de tampon Taq, 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de dNTP (10 mM), 1 µL d'amorces pour MK2 (10 uM), 1.25 unités de Taq polymérase et 9.25 µL d'H₂O. Le produit a été déposé sur un gel d'agarose 2% contenant de l'EtBr 5%, puis migré à 80 V. La présence des bandes correspondant aux amplicons a été détectée par UV (Figure 8).



Figure 8. Gel de génotypage. Représentation des produits PCR et leur migration sur gel d'agarose. Le premier puits correspond à l'échelle de taille d'ADN et les trois suivants correspondent à des échantillons d'ADN provenant de souris MK2 $^{+/-}$, MK2 $^{-/-}$ et MK2 $^{+/+}$ respectivement.

3.3 Millar

Plusieurs paramètres hémodynamiques incluant les pressions artérielles et ventriculaires gauches maximales, minimales et moyennes, le temps et l'indice de relaxation (τ), la pression ventriculaire télé-diastolique et le rythme cardiaque ont été mesurés par Millar chez les souris (n=20) par le service du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Brièvement, les

souris ont été anesthésiées à l'isoflurane, puis un cathéter Millar a été introduit dans l'aorte afin de recueillir les mesures.

3.4 Culture cellulaire

L'aorte thoracique a été isolée, nettoyée, ouverte longitudinalement et découpée en segments. Les morceaux d'aorte de souris ont été placés dans un pétri de 35 mm de diamètre recouvert de Matrigel (BD Biosciences), la face luminale dirigée vers le Matrigel, ce qui favorise l'adhésion et la prolifération des cellules endothéliales (Figure 9), le tout en conditions stériles. Les cellules endothéliales ont été cultivées en présence d'un milieu de culture DMEM (Gibco) auquel ont été ajoutés : pénicilline/streptomycine 1.2%, fungizone 0.8%, sérum fœtal bovin (FBS) 10% (Gibco), Sérum de veau (CS) 10% (Gibco), héparine 90 µg/ml (Sigma) et facteurs de croissance pour les cellules endothéliales (ECGF pour *Endothelial Cell Growth Factors*) 50 µg/ml (BD Biosciences). Les cellules ont été incubées à 37°C en présence d'un mélange gazeux à 5% CO₂, puis passées lorsque suffisamment confluentes. Les expériences ont été réalisées avec des cellules à passage 2, soit 6 à 8 semaines après leur mise en culture. L'origine endothéliale des cellules a été confirmée par immuno marquage avec le facteur de von Willebrand and le CD31 (Voghel *et al.* 2007). Le protocole a précédemment été décrit par Shi et collaborateurs (Shi *et al.* 2000) et reproduit avec succès dans le laboratoire à partir d'artères humaines (Voghel *et al.* 2007) et cérébrales de souris (Drouin *et al.* 2007).

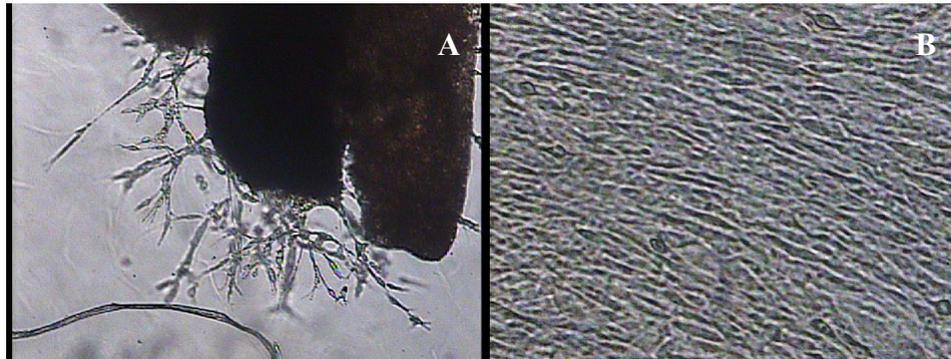


Figure 9. Cellules endothéliales d'aorte de souris en culture. Cellules endothéliales émergeant d'un morceau d'aorte (A) et à confluence (B) sur Matrigel.

3.5 Traitements cellulaires

Lorsque le degré de confluence désiré (environ 80%) a été atteint, les cellules en culture ont été soumises à une période de jeûne de 4 h durant laquelle elles ont été exposées à un milieu de culture DMEM complet dépourvu de sérum et des facteurs de croissance. Ensuite, le milieu a été retiré, puis remplacé par 1 mL du même milieu contenant l'un ou plusieurs des produits chimiques suivants : endotheline-1 (0.1 μM , Calbiochem), SB 203580, un inhibiteur de p38 (1 μM , EMD Biosciences), actinomycine D, un inhibiteur de la transcription (50 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich). Dans le cas du SB, 1 h de pré-incubation entre la période de jeûne et de traitement a été nécessaire. Suite à une incubation à 37°C d'une durée prédéterminée (0, 10, 20, 30, 45 et 60 mins) des cellules endothéliales en présence des agents chimiques, le milieu a été

retiré et les cellules lavées 2 fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) faite à partir de : NaCl (136.8 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KCl (2.7 mM), KH₂PO₄ (1.5 mM), pH=7.4. Une fois traitées, ces cellules ont été lysées pour extraire les protéines ou l'ARN total pour analyse ultérieure par immunobuvardage de type Western ou par PCR, respectivement.

3.6 Immunobuvardage de type Western

Le cœur, les poumons, les reins et le foie de chaque souris ont été isolés, puis immédiatement plongés dans de l'azote liquide et entreposés à -80°C. Afin d'en extraire les protéines, chaque échantillon de tissu a été broyé à l'aide d'un pilon et d'un mortier (Coors) sur glace et dans l'azote liquide afin de maintenir une température très basse. La poudre ainsi obtenue a ensuite été homogénéisée avec un broyeur de tissus (Wheaton) puis incubée 5 mins sur glace dans une solution de tampon de lyse (Tris-HCl pH=7.5 50 mM, β-glycérophosphate 20 mM, fluorure de sodium 20 mM, EDTA 5 mM, EGTA 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Triton 1% (v/v)) auquel a été ajouté un mélange d'inhibiteurs de protéases *Protease Inhibitor Cocktail Kit* (Thermo Scientific). Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé 60 mins à 48 000 rpm et le surnageant a été recueilli.

En ce qui concerne les cellules endothéliales en culture, le milieu de culture a d'abord été retiré et les cellules ont été lavées 2 fois avec une solution de PBS pour être ensuite incubées avec le tampon de lyse durant 5 mins sur glace. Un

gratteur à cellules (Sarstedt) a servi à décoller les cellules. Le lysat cellulaire a été centrifugé 10 mins à 13 000 rpm et le surnageant recueilli.

La concentration de protéines (tissulaires et cellulaires) totales a été quantifiée selon la méthode de dosage par Bradford (BioRad). Pour chaque échantillon, 50 µg de protéines ont été solubilisés dans un tampon Laemmli (Tris-HCl 50 mM pH=6.8, SDS 2.5%, BMG 0.1%, EGTA 1 mM, sucrose 12 M, bleu de bromophénol 0.01%, β-mercaptoéthanol 0.1%). Suite à une séparation par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide 10% SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après un blocage non-spécifique par une incubation dans une solution de TBST (Trizma Base 25 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH=7.5) contenant du lait 5% (Carnation) pour 1 h à température pièce, la membrane a été incubée 16h à 4°C avec un anticorps primaire, dilué dans la solution TBST/Lait, dirigé contre l'une des protéines étudiées : COX-1 (dilution 1:250, Cayman), COX-2 (dilution 1:250, Cayman) et GAPDH (dilution 1:100 000, Ambion). Suivent trois périodes de lavage de la membrane d'une durée de 5 mins dans la solution TBST, la membrane a ensuite été exposée à l'anticorps secondaire adéquat couplé au HRP (*Horseradish Peroxidase*) dilué 1:10 000 dans une solution TBST, pendant 2 h à température pièce. Une dernière série de lavages (3 fois 5 mins) au TBST précède l'étape de révélation des protéines. Les protéines ont

été révélées par chemiluminescence (PerkinElmer), puis exposées sur des films photosensibles (Kodak Film).

La quantification des protéines sur film a été faite par mesure de densité optique des bandes à l'aide d'un numériseur VersaDoc Imaging System 4000 et du logiciel Quantity One (Biorad).

3.7 RT-qPCR

L'ARN total a été extrait des tissus ou des cellules endothéliales à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Brièvement, un échantillon d'environ 30 mg de tissu a été prélevé puis homogénéisé dans le tampon de lyse fourni. En ce qui concerne les cellules en culture, celles-ci ont été lavées, puis incubées avec le tampon de lyse durant 5 min sur glace. L'échantillon homogénéisé de tissu/cellules a alors été passé sur une colonne, puis l'ARN total a été isolé suite à une étape finale d'éluion. L'ARN total a été quantifié par densité optique à 260/280 nm grâce au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

L'ADN complémentaire a été synthétisé par transcription inverse (RT-PCR) par l'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. La réaction a converti 1 µg d'ARN total en 20 µL d'ADNc à 50 ng/µL.

Les paires d'amorces (sens et antisens) spécifiques aux gènes ont été conceptualisées à partir du programme *Clone Manager* (<http://www.scied.com>).

Tableau I. Séquences des amorces spécifiques.

Gène cible	Sens (5' à 3')	Antisens (5' à 3')
PréproET-1	GAGACCCCGCAGGTCCAAGC	TGGGAAGTAAGTCTTCAAGGA ACGC
COX-1	CCGGAGCTGCTGTTCCGAGCC	TTCATTGAAGGGCTGTAGGCG
COX-2	GAACATGGACTCACTCAGTTTGTG	CAAAGATAGCATCTGGACGAGGT
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAGC	ACTGTGGTCATGAGCCCTTCCA

La quantification de l'expression des gènes étudiés a été effectuée selon la technique de réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (QRT-PCR) à l'aide de l'appareil MX3000P (Stratagène). Chaque réaction comprenait 50 ng d'ADNc, les amorces spécifiques (300 nM), le colorant de référence ROX (25 µM) et 12,5 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Pour débiter la réaction PCR, les échantillons ont d'abord été chauffés (10 mins à 90°C), puis ont été soumis à 40 cycles de dénaturation (0.5 mins à 95°C), d'hybridation (1 min à 55°C) et d'amplification des brins d'ADNc (1 min à 72°C). Une courbe de dissociation du produit PCR a été

réalisée afin de vérifier la spécificité de la réaction. Les résultats ont été recueillis et analysés par le programme MxPro (Stratagène). Le programme mesure une valeur de "ct" pour chacun des gènes et exprime les résultats sous forme de variation du ct (Δ ct) par rapport à un échantillon contrôle. Afin de valider la spécificité des amorces, le produit de chacune des paires d'amorces spécifiques a été purifié et séquencé afin de confirmer qu'il s'agissait du gène ciblé.

3.8 Réactivité vasculaire

Les études de réactivité micro-vasculaire ont été effectuées suivant un protocole précédemment décrit dans notre laboratoire (Thorin *et al.* 1998b). Les artères fémorales de souris ont été isolées puis conservées dans une solution saline physiologique (PSS) ayant la composition suivante (en mM): NaCl 119, KCl 1.7, KH_2PO_4 1.18, MgSO_4 1.17, NaHCO_3 24.9, EDTA 0.023, CaCl_2 1.6, glucose 10, pH=7.4. Des segments de 2 mm de ces artères ont ensuite été étirés à 800 mg par deux fils de tungstène insérés dans l'artère et couplés à des capteurs de tension fixés sur un myographe (IMF, University of Vermont, Burlington, VT). Cet appareillage mesure les variations de tension (mg) de l'artère isolée. L'artère a été équilibrée pour une période de 30 mins dans un bain maintenu à 37°C contenant du PSS oxygéné avec 5% de CO_2 , 12% d' O_2 et 83% de N_2 .

La viabilité de l'artère a été vérifiée par une contraction obtenue avec une solution dépolarisante de PSS contenant 40 mM de KCl. Suite à cette contraction, une dose d'acétylcholine (ACh) 10 μ M (Sigma) a été ajoutée afin d'observer une vasodilatation et donc, de confirmer la présence d'un endothélium intact. Deux protocoles ont été effectués par segment d'artère : des courbes concentration-réponse à l'ACh puis à l'endothéline-1 (ET-1) ont été construites en mesurant les variations de tension (mg) en fonction de la concentration d'agoniste ajoutée. Afin de mesurer le potentiel vasodilatateur, une concentration de 1×10^{-9} M à 3×10^{-6} M d'ACh a été ajoutée suite à une précontraction à un analogue de la thromboxane, le U-46619 (3×10^{-8} M, Sigma), en présence ou non d'un inhibiteur de la NO synthase (L-NNA 100 μ M, Sigma), d'un inhibiteur non spécifique des COX (indométacine 10 μ M, Sigma), d'un inhibiteur spécifique de la COX-1 (Valeroyl Salicylate 500 μ M, Cayman Chemical) ou d'un inhibiteur spécifique de la COX-2 (NS-398 10 μ M, Cayman). Le potentiel vasoconstricteur a été mesuré en présence d'une concentration de 0.1 nM à 0.3 μ M d'ET-1, avec ou sans les mêmes inhibiteurs. Afin d'obtenir la valeur référence de contraction maximale, le segment d'artère a été contracté par une solution dépolarisante de PSS contenant 127 mM de KCl. L'artère a été lavée 2 fois avec une solution de PSS entre chaque protocole. Pour chaque courbe concentration-réponse, les valeurs de deux paramètres pharmacologiques, l' EC_{50} (concentration d'agoniste nécessaire pour induire 50% de l'effet maximal) et la contraction/dilatation maximale, ont été

mesurées par le programme Allfit (Deléan, Université de Montréal). Les valeurs de tension sont exprimées en pourcentage de la tension maximale.

3.9 Analyses statistiques

Les valeurs sont présentées sous forme de la moyenne \pm S.E.M. (*Standard error of the mean*) avec un « n » représentant le nombre d'échantillons. Les résultats de myographe, d'immunobuvardage et de qPCR ont été statistiquement analysés à l'aide des tests de t Student et ANOVA. Les résultats statistiques avec une valeur de p inférieure 0.05 ont été considérés significatifs et identifiés avec un « * ».

4. Résultats

4.1 Phénotype cardiovasculaire des souris MK2^{-/-}

Nous avons d'abord mesuré par un cathéter Millar divers paramètres de la fonction cardiaque chez les souris transgéniques MK2^{-/-} (KO) en comparaison avec les souris de type sauvage (WT) sous anesthésie. Bien que la pression artérielle moyenne (Pmoy) soit inchangée entre les deux groupes (73.3±2.0 vs 78.1±3.6 mm Hg; Fig. 10A), la pression ventriculaire télé-diastolique (PV Ped) est significativement augmentée chez les souris KO (6.3±1.0 vs 10.2±1.1 mm Hg; Fig. 10B). Ces changements sont accompagnés d'un temps de relaxation ventriculaire (PV Rt) plus important (44.0±0.4 vs 46.8±0.9 msec; Fig. 10C) et d'un rythme cardiaque (RC) plus bas (434±14 vs 374±20 bpm; Fig. 10D) pour les souris transgéniques MK2^{-/-}. Ces résultats sont en accord avec ce que l'on connaît de la physiologie: un temps de relaxation ventriculaire plus lent permettrait un meilleur remplissage ventriculaire (reflétée par une pression ventriculaire plus élevée à la fin de la diastole) et une fraction d'éjection sanguine plus importante. De plus, les effets bénéfiques pour le système cardiovasculaire d'un rythme cardiaque bas au repos sont reconnus.

Ces résultats semblent conférer à MK2 un nouveau rôle dans la fonction cardiaque, par une modulation du rythme cardiaque et de la fonction ventriculaire.

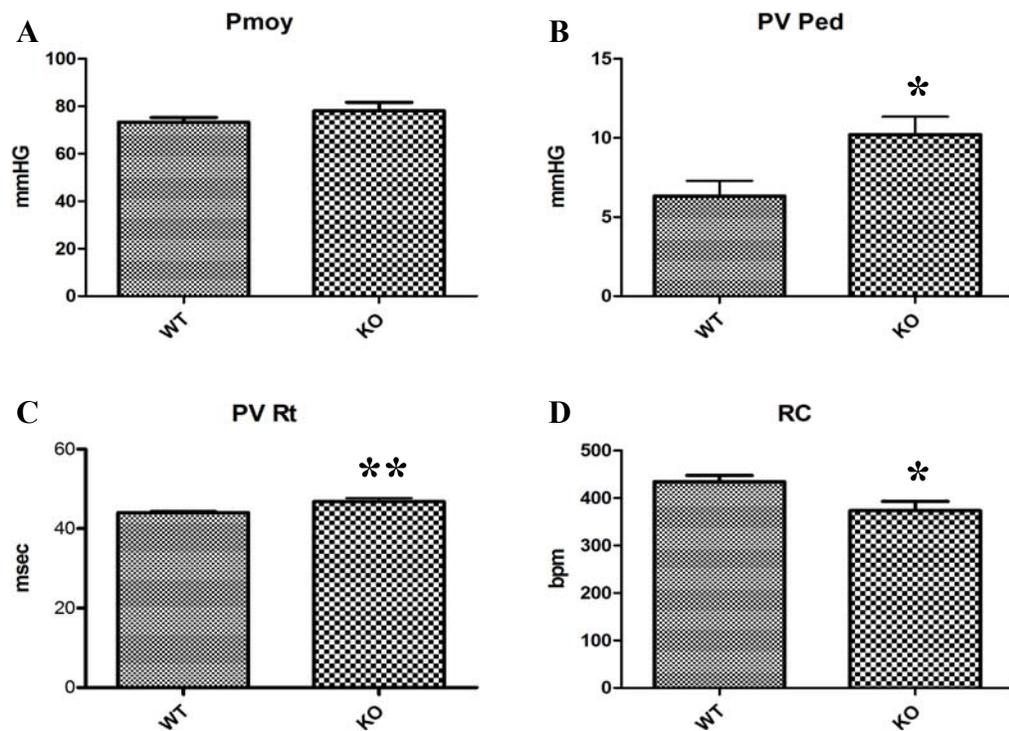


Figure 10. Paramètres de la fonction vasculaire ventriculaire mesurés par Millar. (A) Pressions artérielle moyenne (Pmoy) et (B) ventriculaire télé-diastolique (PV Ped) exprimées en millimètre de mercure (mm Hg), (C) temps de relaxation ventriculaire (PV Rt) exprimé en milliseconde (msec) et (D) rythme cardiaque (RC) exprimé en battements par minute (bpm). $n = 12$ (WT) et 9 (KO, pour $MK2^{-/-}$). Les valeurs de p ont été calculées avec le test de t Student non-pairé (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$).

4.2 Expression de PPET-1, COX-1 et COX-2 en réponse à ET-1.

Nous avons ensuite observé comment les cellules endothéliales réagissent au niveau de l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du tonus vasculaire lorsque la concentration d'ET-1 dans le milieu augmente. Ainsi nous avons quantifié par RT-qPCR les niveaux d'ARNm de la PPET-1, de COX-1 et de COX-2. Nous avons d'abord étudié l'autorégulation de l'ET-1 au niveau de l'expression de son précurseur, la PPET-1. Dans les cellules endothéliales aortiques de souris (CEAS) WT en culture, l'expression de la PPET-1 augmente significativement en présence d'une dose exogène d'ET-1 (0.1 μ M). En effet, après 40 mins d'incubation, la quantité d'ARNm de la PPET-1 est augmentée de plus de deux fois (0.8 ± 0.2 vs 2.8 ± 0.3 UA, $p < 0.05$) et cette augmentation s'accroît après 60 mins d'incubation (3.9 ± 0.6 UA, $p < 0.05$) en comparaison avec le temps d'incubation 0 min (Fig. 11A).

Puisque les COX sont aussi exprimées dans les cellules endothéliales et participent à la production d'agents vasomoteurs, l'expression de leur messager a été quantifiée en réponse à l'ET-1. Nos résultats démontrent que l'ET-1 cause une diminution significative de l'expression de COX-1 à 45 mins d'incubation (0.7 ± 0.1 vs 0.3 ± 0.1 UA, $p < 0.05$), ce qui représente une diminution de presque la moitié par rapport au temps contrôle (Fig. 11B). Bien que l'expression de COX-2 tende à augmenter faiblement, nous n'avons pas observé de variations

significatives aux différents temps d'incubation (Fig. 11C) et ce, de nouveau chez les souris WT.

Afin d'étudier le rôle de la kinase MK2, impliquée dans la régulation de plusieurs gènes au niveau de l'ARNm, nous avons choisi d'observer l'impact d'une absence de MK2 sur la variation de l'expression de nos gènes d'intérêt. Nous avons donc répété les mêmes expériences, mais cette fois avec des cellules endothéliales provenant de souris transgéniques MK2-déficientes (MK2^{-/-}). La comparaison entre l'expression génique des WT et de KO sera abordée dans le paragraphe suivant. La variation de l'expression des trois gènes étudiés en fonction du temps d'incubation à la même dose d'ET-1 exogène (0.1 μ M) était similaire à celle observée dans des cellules endothéliales WT. Effectivement, l'ARNm de la PPET-1 augmente significativement après 60 mins (5.9 \pm 1.9 UA, $p < 0.05$) d'incubation à l'ET-1 (Fig. 11D). L'expression de la COX-1 diminue également chez les MK2^{-/-} en présence d'ET-1. Cette diminution est significative après 60 mins d'incubation (0.8 \pm 0.1 vs 0.5 \pm 0.1 UA, $p < 0.05$) (Fig. 11E). De même, bien que l'expression de la COX-2 tende à augmenter, nous n'avons pas obtenu de différences significatives avec les différents temps d'incubation (Fig. 11F).

Ces résultats démontrent que l'ET-1 fait varier sa propre expression en plus de celle des COX au niveau du messager en fonction du temps d'exposition.

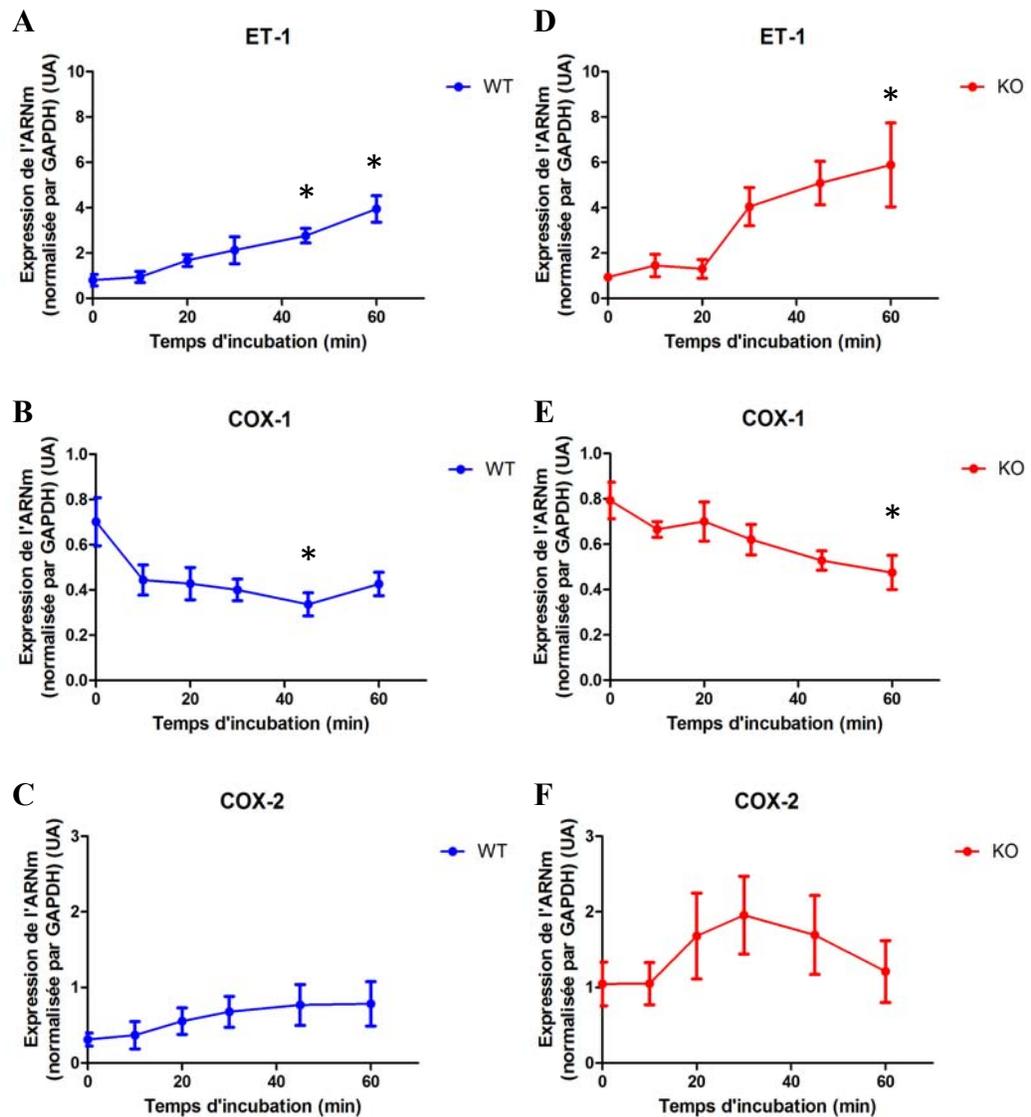


Figure 11. Impact de l'ET-1 et MK2 sur l'expression de la PPET-1, COX-1 et COX-2. Quantification par RT-qPCR de l'ARNm de la PPET-1 (A et D), de COX-1 (B et E) et de COX-2 (C et F) en fonction du temps d'incubation en minutes (min) à une dose d'ET-1 exogène (0.1 μ M). L'ARN a été extrait à partir de CEAS en culture provenant de souris contrôles de type sauvage (WT,

bleu : A, B, C) ou transgéniques MK2^{-/-} (KO, rouge : D, E, F). Les valeurs sont comparés par rapport au temps d'incubation = 0, normalisées avec le gène du GAPDH et exprimées en unités arbitraires (UA). Les valeurs p ont été calculées avec un test ANOVA *one-way* (* : p<0.05; n = 3 à 6).

4.3 La régulation de l'ARNm dépendante de MK2

Bien que les variations dans l'expression des gènes soient reproduits (augmentation, diminution et absence de variation sont conservées) d'un génotype à l'autre, nous avons décelé des divergences entre ces deux patrons de variations puisque la comparaison des niveaux d'ARNm entre les cellules provenant de souris WT avec celles provenant de souris MK2^{-/-} KO révèle qu'à certains points, l'expression de la PPET-1, de COX-1 et de COX-2, aux mêmes temps d'incubation, est significativement supérieure chez les KO. En effet, chez les souris transgéniques, la PPET-1 est plus abondante (Fig. 11A vs D) après 45 mins d'incubation à l'ET-1 (2.8±0.3 vs 5.1±1.0 UA, p<0.05). La COX-1 est plus exprimée en absence de MK2 (Fig. 11B vs E) à 10 mins (0.4±0.1 vs 0.7±0.1 UA, p<0.05), 20 mins (0.4±0.1 vs 0.7±0.1 UA, p<0.05), 30 mins (0.4±0.1 vs 0.6±0.1 UA, p<0.05) et 45 mins (0.3±0.1 vs 0.5±0.1 UA, p<0.05) d'incubation. La quantité d'ARNm de COX-2 diffère aussi (Fig. 11C vs F) aux temps d'incubation de 0 min (0.3±0.1 vs 1.0±0.3 UA, p<0.05) et 30 mins (0.7±0.2 vs 2.0±0.5 UA, p<0.05). Les valeurs p ont été obtenues par un test de t Student non-pairé.

La réponse à l'ET-1 sur l'ARNm observée précédemment est donc influencée par MK2.

4.4 La synthèse et la stabilisation de l'ARNm de la PPET-1

La variation d'ARN mesurée lors de la réponse à l'ET-1 peut être due à une augmentation de sa stabilité, ou une augmentation de sa production, ou encore une contribution des deux. Afin d'éclaircir ce sujet, nous avons stimulé des CEAS provenant de souris WT en culture avec des traitements seuls ou combinés d'ET-1 (0.1 μ M), d'inhibiteur de p38 (SB203580, 1 μ M) afin de mimer les souris MK2^{-/-} et d'inhibiteur de la synthèse d'ARNm (actinomycine D, 50 μ g/mL). Les traitements sont d'une durée de 45 mins précédés d'une pré-incubation de 1h avec du SB203580 lorsque approprié. Nos résultats démontrent que le SB203580 seul ou combiné avec l'ET n'a pas d'effet significatif sur le niveau d'ARNm.

L'actinomycine D seul n'a également pas d'effets sur la quantité basale d'ARNm à part une modeste tendance à faire baisser les niveaux d'ARNm. Cependant, lorsque combiné à l'ET-1, l'actinomycine D empêche l'augmentation de l'expression de la PPET-1 (ET vs Act D+ET : 2.8 ± 0.3 vs 0.6 ± 0.1 AU, $p < 0.05$) (Fig. 12), suggérant un effet transcriptionnel plutôt que stabilisateur de l'ARNm pour expliquer les variations induites par l'ET-1.

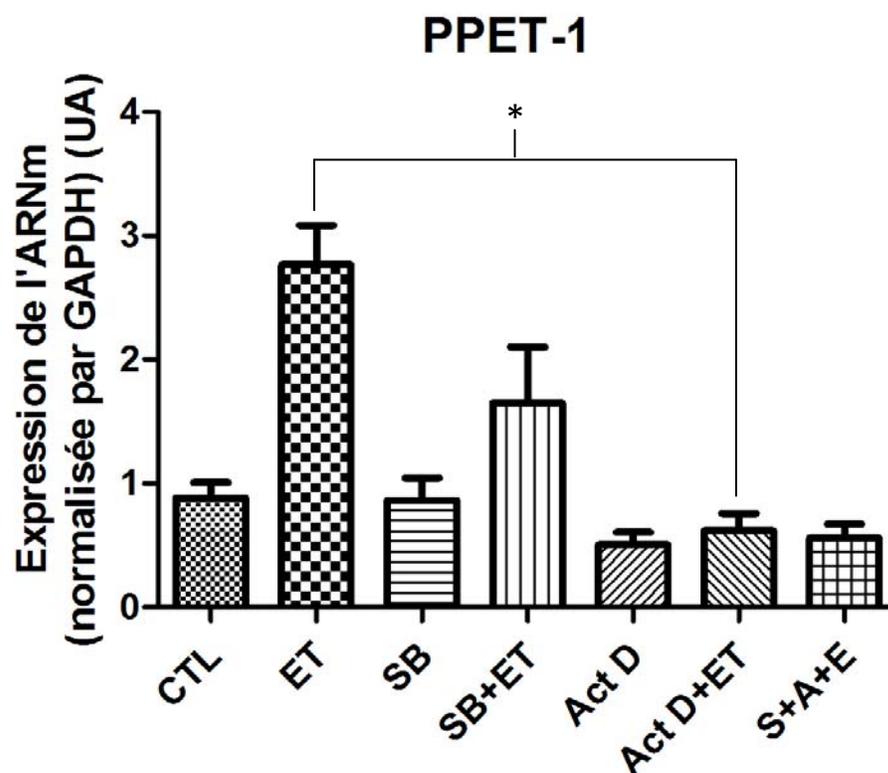


Figure 12. L'induction de l'expression de PPET-1 est bloquée par l'actinomycine D. Quantification de l'ARNm de la PPET-1 suite aux divers traitements. Les cellules sont traitées durant 45 mins avec un ou plusieurs des composés suivants : ET-1 (0.1 μ M), SB203580 (1 μ M), actinomycine D (50 μ g/mL). Les valeurs sont normalisées avec le gène du GAPDH et exprimées en unités arbitraires (UA). Les valeurs p ont été calculées avec un test ANOVA *one-way* (* : $p < 0.05$, ET vs Act D+ET, n = 5 à 7).

4.5 Réponses contractiles à l'ET-1

Les courbes concentration-réponse à l'ET-1 démontrent que la contraction des artères fémorales de souris WT est comparable à celles provenant de souris KO (n=7 et 9 respectivement). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux courbes, tant dans la valeur de contraction maximale ($64\pm 8\%$ vs $75\pm 3\%$, WT vs KO), que dans la valeur d' EC_{50} ($(6.3\pm 1.3$ vs $7.1\pm 0.7) \times 10^{-9}$ M, WT vs KO) (Fig. 13A). La réponse contractile est cependant la résultante globale d'une interaction entre les différents EDCF et les différents EDRF libérés. Afin de déterminer s'il existe des différences entre les EDCF et EDRF libérés dans les artères WT et $MK2^{-/-}$, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de la eNOS et des COX. Chez les souris WT, la contraction de segments d'artères fémorales à l'ET-1 est accentuée en présence d'un inhibiteur des COX (indométacine, 10 μ M) ou d'un inhibiteur de la NO synthase (L-NNA, 100 μ M) (Fig. 13B). En effet, en comparaison avec la contraction maximale en situation contrôle sans traitement ($64\pm 8\%$ de la contraction maximale au PSS 127 mM KCl), la contraction maximale en présence d'indométhacine ($90\pm 2\%$) ou de L-NNA ($83\pm 3\%$) est significativement augmentée ($p < 0.05$). Cependant, dans les artères provenant de souris $MK2^{-/-}$, l'ajout de l'un ou l'autre des deux inhibiteurs n'a eu aucun effet sur la réponse vasculaire à l'ET-1, ni la contraction maximale ni l' EC_{50} ne variait entre les différentes courbes (Fig. 13C). Ces observations démontrent une implication de

mécanismes dépendants du NO et des COX dans la réponse contractile à l'ET-1. L'absence de MK2 a un effet marqué sur ce mécanisme de contraction, car ces deux voies ne semblent plus être sollicitées.

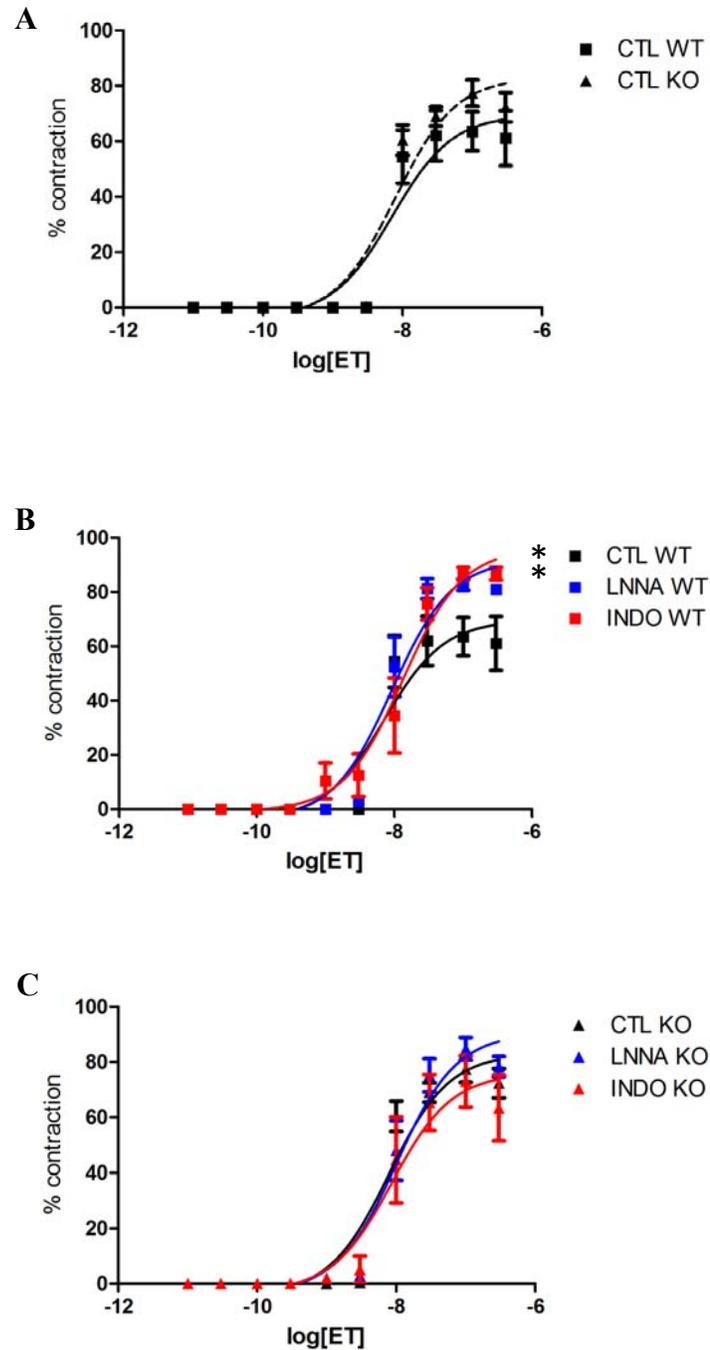


Figure 13. Réponses contractiles d'artères fémorales provenant de souris WT (■) et KO (▲) à des concentrations croissantes d'ET-1. (A) Contraction d'artères provenant de souris WT et KO, sans agent inhibiteurs. (B) Courbes concentration-réponse d'artères provenant de souris WT, sans inhibiteur (CTL, noir), en présence de L-NNA (bleu) ou d'indométacine (rouge). (C) Contractions chez des souris KO, en absence (CTL, noir) ou présence de L-NNA (bleu) ou d'indométacine (rouge). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la concentration maximale induite par la solution KCl 127 mM. (* : $p < 0.05$ vs CTL; $n = 5$ à 9).

4.6 La dilatation induite par ACh est conservée chez les $MK2^{-/-}$

Le tracé des courbes de relaxation à une concentration croissante d'ACh démontre que cette relaxation n'est pas altérée chez les souris KO. En effet, la relaxation maximale est comparable entre les artères provenant de souris contrôles et les souris transgéniques ($100 \pm 2\%$ vs $100 \pm 1\%$ respectivement, $n=3$) et ce, même en inhibant la production de NO par du L-NNA $100 \mu\text{M}$ ($75 \pm 1\%$ vs $49 \pm 12\%$ respectivement, $n=3$). Les valeurs d' EC_{50} ne diffèrent pas non plus : (6.7 ± 4.2 vs 6.9 ± 2.6) $\times 10^{-8}$ M et (6.4 ± 3.6 vs 12.4 ± 6.9) $\times 10^{-8}$ M, sans ou avec L-NNA respectivement. Le L-NNA a significativement diminué la relaxation maximale pour chacune des deux courbes ($p < 0.05$, $n=3$), soit pour le groupe WT (Fig. 14A) ainsi que pour le groupe KO (Fig. 14B), sans affecter l' EC_{50} . De plus, la force de pré-contraction à l'analogue du thromboxane (U-46619

3×10^{-8} M) était inchangée entre les souris WT et les souris KO ($41 \pm 3\%$ vs $36 \pm 6\%$ mg, respectivement, les valeurs sont exprimées en pourcentage de la concentration maximale induite par la solution KCl 127 mM, n= 6). À première vue, le génotype MK2 ne semble donc pas influencer la réponse vasodilatatrice à l'ACh.

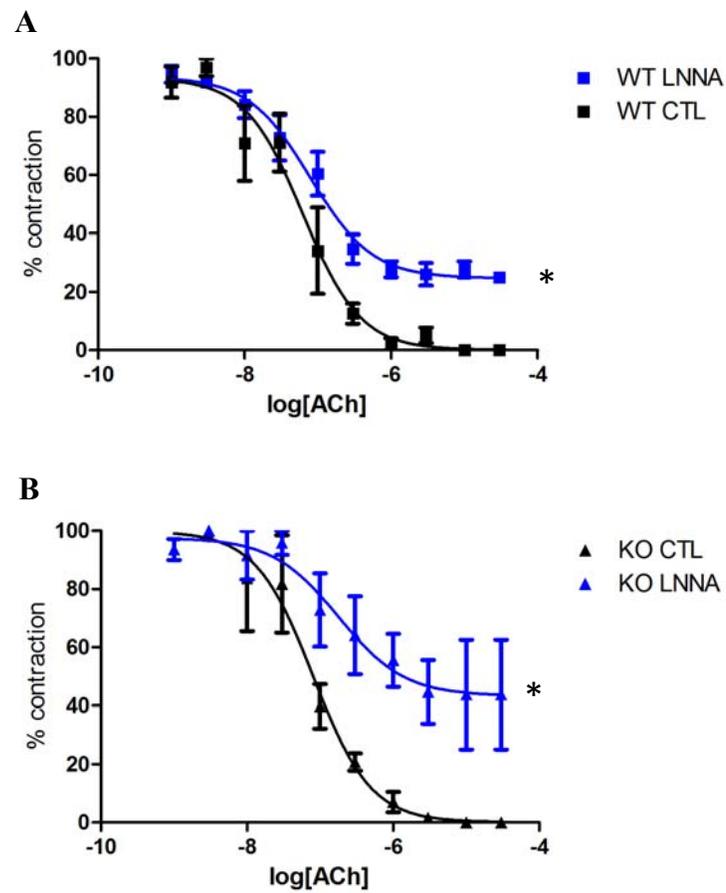


Figure 14. Courbes concentration-réponse d'artères fémorales provenant de souris WT (A) ou de souris KO (B) à l'ACh en présence (bleu) ou non (noir) d'un inhibiteur de la NOS, le L-NNA à 100 μ M. La relaxation à l'ACh (représentée par la diminution de la contraction) est exprimée en % de la pré-contraction induite par l'analogue du thromboxane, le U-46619 à 3×10^{-8} M. (* : $p < 0.05$ vs CTL; $n=3$).

5. Discussion

Lorsqu'exacerbée, la réponse vasculaire induite par l'ET-1 contribue au développement de plusieurs pathologies telles que l'hypertension et l'inflammation (Miyachi & Masaki 1999). Dans ce cas, la réponse contractile à l'ET-1 et sa production sont augmentées alors qu'en contrepartie, la biodisponibilité du NO est réduite (Vanhoutte 2000). Le thromboxane et la prostacycline, dont les précurseurs sont synthétisés par la COX, participent aussi au développement de maladies inflammatoires (Rao & Knaus 2008). Cette présente étude vise à étudier le rôle de MK2 dans la réponse vasculaire induite par l'ET-1 puisque l'activité de cette kinase est nécessaire à la régulation et à la production de plusieurs cytokines telles que le TNF- α , et certaines interleukines (Neininger *et al.* 2002; Ehling *et al.* 2007; Su *et al.* 2008). De plus, il a été démontré qu'une délétion de MK2 *in vivo* atténuait le phénotype pathologique inflammatoire (Culbert *et al.* 2006; Hegen *et al.* 2006; Jagavelu *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2008).

5.1 Phénotype cardiovasculaire bénéfique chez les souris MK2^{-/-}

Les paramètres hémodynamiques que nous avons enregistrés *in vivo* suggèrent que les souris déficientes en MK2 ont une fonction vasculaire cardiaque différée par un rythme cardiaque diminué bien que la pression artérielle soit

inchangée (Fig. 10). Ceci suggère un nouveau lien entre MK2 et la fonction cardiaque par un mécanisme encore inconnu.

Plusieurs études cliniques ont démontré qu'une réduction du rythme cardiaque au repos, dans une population saine ou atteinte de maladies cardiovasculaires, était bénéfique pour la prévention du développement de certains événements cardiovasculaires et permettait de réduire le taux de mortalité d'origine cardiaque ou non (Diaz *et al.* 2005; Jouven *et al.* 2005). L'effet bénéfique des bêtabloquants utilisés pour traiter les patients coronariens est justement attribué à une baisse du rythme cardiaque (Lechat *et al.* 2001; Metra *et al.* 2005).

Chez nos souris transgéniques, la réduction du rythme cardiaque au repos est logiquement associée à un temps de relaxation ventriculaire plus long et une pression télé-diastolique plus élevée. Ces observations suggèrent que MK2 est impliqué dans la régulation du rythme cardiaque. En réduisant le rythme de base, le myocarde diminue sa consommation d'oxygène. Le cycle cardiaque étant plus long, cela favorise le remplissage ventriculaire, et il expulse un plus gros volume sanguin à chaque battement. Ces effets bénéfiques sur la consommation d'oxygène sont reproduits par l'ivabradine, un inhibiteur spécifique des courants I_f qui induit également une diminution du rythme cardiaque (Berdeaux 2007). Ainsi, nos résultats démontrent de nouvelles

propriétés cardioprotectrices lorsque MK2 est réprimée (MK2^{-/-}) en réduisant le rythme cardiaque au repos.

5.2 L'influence à court terme de l'ET-1 sur l'ARNm

L'ET-1 induit la vasoconstriction des artères en activant ses récepteurs ET_B et ET_A situés sur le muscle lisse. Toutefois, la réponse vasculaire se complexifie, car l'ET-1 induit la production et la libération de plusieurs autres facteurs vasoactifs. En effet, le NO et la PGI₂ sont produits pour contrecarrer les effets de l'ET-1 sur les vaisseaux (Boulanger & Luscher 1990; Kourembanas *et al.* 1993; Mitsutomi *et al.* 1999).

5.2.1 La boucle de régulation de l'ET-1

Le premier peptide que nous avons choisi d'étudier dont l'expression pouvait être régulée par l'ET-1 était la PPET-1. En effet, puisque la littérature est divisée à ce sujet, nous avons cherché à déterminer dans quel sens l'ET-1 pouvait moduler sa propre synthèse. Nous avons ainsi démontré, en accord avec d'autres groupes (Saijonmaa *et al.* 1992; Ito *et al.* 1993; Iwasaki *et al.* 1995; Saito *et al.* 1995; Yamakaw *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003), qu'à court terme l'ET-1 favorisait sa propre expression (Fig. 11A). En extrapolant ces résultats sur une plus longue période et en se basant sur ceux déjà publiés (temps d'incubation à l'ET-1 exogène allant jusqu'à 24 h pour certaines études (Iwasaki *et al.* 1995; Yamakaw *et al.* 2002)), cette observation permettrait en

partie d'expliquer pourquoi la contraction à l'ET-1 est soutenue pour une longue durée : une étude chez le rat révèle qu'une injection intraveineuse d'ET-1 pouvait induire une réponse vasoconstrictrice maintenue durant plus d'une heure (Masaki 1994). La longue durée de l'interaction entre l'ET-1 et son récepteur suite à l'endocytose (l'ET-1 reste associé durant 2 h à l'ET_A à l'intérieur de la cellule (Hunley & Kon 2001)) peut aussi expliquer la réponse soutenue à l'ET-1. Alors que les études démontrant une autorégulation négative de l'ET-1 utilisaient des cellules endothéliales d'aorte de porc et travaillaient avec des temps d'incubation beaucoup plus longs (jusqu'à 24 heures) (Sanchez *et al.* 2002; Farhat *et al.* 2008), nous avons plutôt étudié ce phénomène chez la souris et ce, à très court terme, ce qui serait en mesure d'expliquer ces divergences dans les résultats.

Ces résultats pourraient à première vue aller à l'encontre de certains travaux (Boulanger et al) qui suggèrent que le NO, suite à l'activation des récepteurs à l'ET-1, produise un effet rétro-inhibiteur sur l'expression de l'ET-1. Boulanger et collaborateurs rapportent que la thrombine augmente la production d'ET-1 dans l'aorte de porc et que cet effet est accentué en bloquant la production de NO. Ces résultats suggèrent qu'une réponse stimulatrice de l'ET-1 par la thrombine est accompagnée d'une réponse inhibitrice par le NO, ce qui pourrait représenter un mécanisme de rétroaction négative permettant la régulation de la production d'ET-1. Cependant, l'effet global est une augmentation de la

production d'ET-1. Un mécanisme similaire pourrait s'appliquer à notre modèle. Pour vérifier si le NO, dans notre modèle, induit une réponse retro-inhibitrice, il faudrait tester l'effet de l'inhibition de la NOS endothéliale sur l'expression de l'ARNm de la PPET-1 suite à une stimulation à l'ET-1.

5.2.2 ET-1 régule la forme constitutive de COX

Puisque les prostanoïdes sont également de puissants agents vasoactifs, nous avons étudié l'influence de l'ET-1 sur les COX dans notre modèle. Des deux isoformes de COX, la forme constitutive, COX-1, serait principalement responsable de la production d'EDCF. En effet, son expression dans les cellules endothéliales est augmentée avec l'inflammation et le vieillissement, ce qui expliquerait pourquoi la libération de prostanoïdes vasoconstricteurs est plus élevée dans ces situations (Tang & Vanhoutte 2008). Pour ces raisons, la diminution de l'expression de COX-1 que nous avons observée (Fig. 11B) empêcherait la cellule endothéliale saine de produire encore plus de facteurs constricteurs en présence d'ET-1, ce qui empêcherait une contraction exagérée. Il s'agirait en quelque sorte d'un mécanisme de défense au niveau post-transcriptionnel. L'autre isoforme de la COX, la COX-2 inductible, a aussi été étudiée. Dans des cardiomyocytes sains isolés de ventricule de rat, cette enzyme favorise la production de prostacycline, un prostanoïde vasorelaxant, lorsque stimulé par des facteurs de croissance, l'angiotensine II et l'endothéline-1 (Rebsamen *et al.* 2003). Toutefois, nos résultats ne démontrent

pas de variation dans l'expression de l'ARNm codant pour COX-2 et ce, malgré une incubation à l'ET-1 d'une durée allant jusqu'à 1 h (Fig. 11C). Des résultats similaires ont été obtenus à partir de cellules endothéliales de la microvasculature cérébrale : une incubation de 24 h avec de l'ET-1 dans le milieu de culture n'avait aucun effet sur l'expression de COX-2 (Yakubu & Leffler 2005). Toutefois, dans d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales, musculaires lisses et les cardiomyocytes, l'ET-1 stimule l'expression de COX-2 (Gallois *et al.* 1998; Chen *et al.* 2003; Rebsamen *et al.* 2003; Peng *et al.* 2008). Afin de réconcilier les différences, nous croyons que l'ET-1 peut induire l'expression de COX-2 à des temps d'incubation plus longs et que la quantité de COX-2 retomberait au niveau basal, le tout dans une fenêtre de 1 h à 24 h d'incubation, puisque c'est l'intervalle de temps entre notre étude et celle de Yakubu et Leffler. L'induction de COX-2 et la production subséquente de prostacycline est une réponse importante pour le maintien du tonus vasculaire en régulant la réponse à l'ET-1, induction qui pourrait inhiber la réponse et la production de l'ET-1 (de Nucci *et al.* 1988; Miyauchi & Masaki 1999).

Prises comme un tout, ces données révèlent que l'ET-1 induit l'expression de la PPET-1, réprime celle de COX-1 et n'affecte pas celle de COX-2 dans un intervalle de temps d'incubation à de l'ET-1 exogène situé entre 0 et 60 minutes.

5.3 MK2 dans la régulation génique induite par ET-1

En utilisant des cellules isolées à partir de souris déficientes en MK2, nous avons pour but de caractériser l'importance de MK2 dans la régulation de l'expression de nos gènes d'intérêts. La première observation est que l'augmentation du messager de la PPET-1 induite par ET-1 était légèrement retardée en absence de MK2. En effet, dans les souris WT, l'augmentation de PPET-1 survenait après 45 mins d'incubation à l'ET-1, alors que chez les KO, cette augmentation n'était détectable qu'après 60 mins. Nos résultats suggèrent donc que MK2 est impliqué dans l'autoinduction rapide de l'ET-1. La diminution du messager de la COX-1 induite par ET-1 était également retardée en absence de MK2 : la diminution significative de la quantité d'ARNm de COX-1 se manifeste après 45 mins d'incubation alors qu'elle est retardée de 15 mins en absence de MK2. Ceci suggère que la voie de MK2 est importante dans la modulation précoce de ces ARNm, dans les courts instants suivant l'ajout d'ET-1. La deuxième observation est que pour chacun des trois gènes étudiés (PPET-1, COX-1 et COX-2), l'ARNm était plus abondant dans les cellules dépourvues de MK2 (Fig. 11 bleu vs rouge). Puisque la quantité d'ARNm mesurée est le résultat de l'apport combiné entre la production et la stabilisation de l'ARNm, nos données renforceraient le concept selon lequel MK2 est impliqué dans la réponse génique vasculaire rapide à l'ET-1. Donc, MK2 aurait deux rôles sur la modulation de l'ARNm lorsque stimulée par l'ET-1, le

premier étant l'induction rapide des variations des niveaux d'ARNm de la PPET-1 et la COX1, le deuxième étant une contribution à diminuer les ARNm des trois gènes au cours de l'incubation. Cependant, nous ne pouvons, à ce point, que spéculer sur les mécanismes par lesquels MK2 régule l'ARNm de ces gènes.

Bien que nous sachions qu'un changement des niveaux d'ARNm ne reflète pas systématiquement une variation dans l'expression de la protéine mature et active, l'expérience vise surtout à démontrer l'implication de MK2 dans la régulation de ces protéines au niveau de l'ARNm, puisque ce rôle a déjà été démontré pour d'autres gènes, tel que TNF- α (se référer à la section 1.5.1). De plus, certaines limitations techniques nous empêcheraient de doser la forme peptidique de l'ET-1 ou d'éicosanoïdes matures. En effet, les variations d'expression entre les MK2^{+/+} et MK2^{-/-} sont observés que suite à une stimulation et non en condition basale. Ceci impliquerait qu'il faudrait isoler et quantifier les peptides suite à une stimulation à l'ET-1, ce qui s'avère à être une tâche difficile, puisque ces peptides possèdent une très courte demi-vie. De plus dans le cas de l'ET-1, il faudrait différencier l'ET-1 sécrétée de l'ET-1 exogène ajoutée pour la stimulation.

5.4 L'ET-1 augmente la synthèse de l'ARNm de la PPET-1

L'inhibition de la synthèse *de novo* de molécules d'ARNm par l'actinomycine D et l'inhibition de la voie p38 MAPK par le SB203580 ont permis de comprendre un peu mieux comment l'ET-1 induit sa propre expression *via* l'ARNm de la PPET-1. Puisque le SB203580, seul ou en présence d'ET-1, n'avait aucun effet sur les niveaux d'ARNm de la PPET-1, nous pouvons suggérer que la stabilité de l'ARNm codant pour la PPET-1 n'est pas la principale voie induite par l'ET-1. En effet, lorsque activée par différents stress comme l'inflammation, la voie p38 MAPK est impliquée dans la régulation de la stabilité de plusieurs ARNm, notamment *via* MK2 (Winzen *et al.* 1999; Bollig *et al.* 2002). Pourtant, on observe une différence entre l'ARNm provenant des MK2^{-/-} en comparaison avec celui provenant des MK2^{+/+}, différence qui n'est pas retrouvée avec l'inhibition de la voie p38 MAPK. Bien que nos résultats ne soient pas en mesure d'expliquer ce paradoxe, il est important de noter les distinctions importantes entre les deux situations. Premièrement, le traitement au SB203580 est une inhibition aiguë de la voie p38 MAPK alors que la délétion de MK2 est établie dès la naissance, donc chronique. Dans le cas échéant, l'organisme a pu mettre au point des systèmes de compensation. Ce dernier point sera élaboré plus bas dans cette discussion. Deuxièmement, le SB203580 inhibe effectivement MK2, mais également toute la voie de signalisation en aval de p38. Puisque celle-ci est une voie importante dans le métabolisme cellulaire, plusieurs effets secondaires sont à prévoir. Une

autre explication possible serait que MK2 soit également activée par une autre voie que celle de p38 suite à une stimulation par ET-1. Par exemple, il a été publié que ERK1/2 pouvait phosphoryler MK2 *in vitro*, mais hélas, il a ensuite été démontré que ERK1/2 n'était pas une kinase physiologique de MK2 (Roux & Blenis 2004).

En revanche, l'actinomycine D a aboli l'induction de l'expression de la PPET-1 lorsque combinée à de l'ET-1 (Fig. 12). Ceci suggère que l'ET-1 augmente l'expression de la PPET-1 par des mécanismes de synthèse d'ARNm. Ces résultats sont en accord avec des observations voulant que l'ET-1 stimule le recrutement de la polymérase II sur le promoteur du gène de l'ET-1, *Edn1* (Farhat et al. 2008).

5.5 Mécanismes de compensation : MK3 comme roue de secours

De manière surprenante, nous avons réalisé que mis à part ces quelques différences entre les souris WT et MK2^{-/-}, les variations des quantités d'ARNm induite par l'ET-1 n'étaient pas frappantes. Nous ne pouvons donc pas affirmer que MK2 soit primordiale dans la réponse génique vasculaire induite par ET-1, du moins à court terme. Ces observations vont à l'encontre de nos attentes puisqu'il a été démontré que la voie p38 MAPK est activée par l'ET-1 (Kawamura *et al.* 1999; Lee *et al.* 2007) et que MK2 est notamment impliquée dans la régulation de COX-2 au niveau de l'ARNm dans certains types

cellulaires (Jang *et al.* 2000; Alcaide & Fresno 2004; Di Mari *et al.* 2007). Ces observations peuvent être de nouveau expliquées par notre modèle expérimental qui focalise sur des temps d'incubation courts afin de voir les variations rapides suite à un traitement aigu à l'ET-1. Toutefois, puisque l'ET-1 et les COX sont des acteurs primordiaux dans le maintien du tonus vasculaire à l'état sain, il est possible que dans notre modèle MK2^{-/-}, des mécanismes de compensation se soient développés. Nous utilisons un modèle de souris déficientes en MK2 de façon ubiquitaire dès la naissance, ce qui favoriserait ainsi une dérégulation très prononcée des COX et de l'ET-1. Ceci pourrait expliquer pourquoi les effets d'une délétion de MK2 soient partiellement compensés. Un candidat potentiel pour la substitution de MK2 serait la MK3, une autre kinase activée par la voie p38 MAPK. En effet, ces deux kinases possèdent 75% d'homologie dans leur séquence d'acides aminés (Gaestel 2006; Ronkina *et al.* 2008) et plusieurs travaux démontrent une redondance dans leurs fonctions (Gaestel 2006). Notamment, MK2 et MK3 peuvent toutes les deux phosphoryler la protéine Hsp27 *in vivo* en reconnaissant les mêmes motifs (McLaughlin *et al.* 1996). Ronkina et ses collaborateurs ont mis sur pied une étude avec des souris MK2 et/ou MK3 déficientes afin de caractériser leurs fonctions compensatoires. Voici ce qu'ils ont observé : MK2 et MK3 sont toutes les deux impliquées dans la production de cytokines par l'activation de la voie p38 MAPK, bien que MK2 soit plus actif que MK3. Des souris déficientes en MK3 et MK2 exprimaient moins de TTP, p38 et de TNF- α que des souris uniquement MK2

déficientes, alors que des souris uniquement MK3 déficientes ne manifestaient pas de différences dans la réponse inflammatoire (Ronkina *et al.* 2007). Ceci démontre que les deux kinases agissent de pair pour réguler la production de cytokines induite par le stress. MK3 pourrait donc compenser en partie pour la perte de MK2, du moins dans le mécanisme de régulation de l'expression du messager des COX et de la PPET-1 en réponse à l'ET-1 et ainsi atténuer les variations attendues. Cette possibilité reste à être démontrée.

5.6 La réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 est accentuée par l'inhibition de la production de PGI₂ et du NO

Il a déjà été démontré que les voies MAPK sont impliquées dans la réponse contractile (Dessy *et al.* 1998) initiée par l'ET-1 (Kwon *et al.* 2003; Lee *et al.* 2007) ou même dans un contexte pathologique tel que l'hypertension (Kim *et al.* 2004; Kwon *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005). Bien que parmi les voies MAPK, ERK soit généralement associée à la contraction des muscles lisses, une étude a démontré qu'une diminution de l'activité de la voie p38 MAPK serait à l'origine d'une réponse vasoconstrictrice diminuée à l'ET-1 dans un modèle de rat hypertendus (Kim *et al.* 2004). Nos résultats montrent que la réponse contractile à l'ET-1 est inchangée chez les souris MK2-déficientes (Fig. 13A). Cependant, la réponse contractile est la résultante d'une interaction entre les différents EDCF et EDRF libérés. Nous avons donc traité les vaisseaux avec un inhibiteur non-spécifique des COX, l'indométacine, ou un inhibiteur de la

production du NO par la NO synthase, le L-NNA. Dans les souris contrôles, la contraction à l'ET-1 était plus prononcée en inhibant les COX ou la NOS (Fig. 13B). En inhibant les COX, on empêche la production de prostanoides vasorelaxants tels que la prostacycline pouvant être induits par l'ET-1 (de Nucci *et al.* 1988; Rebsamen *et al.* 2003). Le NO est une autre molécule vasorelaxante induite par l'ET-1 (de Nucci *et al.* 1988). Non seulement ces deux substances possèdent des effets vasomoteurs opposés à l'ET-1, mais peuvent aussi inhiber sa production (Kourembanas *et al.* 1993; Mitsutomi *et al.* 1999). En diminuant ainsi l'apport vasodilatateur, par l'inhibition de la production de PGI₂ et de NO, en présence d'un vasoconstricteur, l'ET-1, on penche la balance vers une vasoconstriction plus prononcée. Plusieurs maladies inflammatoires et cardiovasculaires sont justement liées à une diminution de la biodisponibilité du NO (Vanhoutte 2000).

5.6.1 Les MK2^{-/-} sont insensibles à l'inhibition de COX et NOS

L'apport de ces deux facteurs vasodilatateurs ne semble pas primordial dans la vasoconstriction induite par l'ET-1 des artères provenant de souris transgéniques, puisque ni l'indométacine ni le L-NNA n'ont exacerbé la contraction (Fig. 13C). L'explication la plus simple pour ce phénomène serait que chez les souris MK2-déficientes, la réponse contractile à l'ET-1 n'est pas contrebalancée par le NO ou la PGI₂. Ainsi, dans les souris KO, la production de ces agents vasorelaxants est absente, ce qui pourrait conduire à une

vasoconstriction globale plus forte. Pour combler ce déficit, les cellules vasculaires dépourvues de MK2 nécessiteraient donc recours à un autre système de vasodilatation : celui des EDHF. Ainsi, dans les souris transgéniques MK2^{-/-}, la contraction induite par l'ET-1 serait balancée non pas uniquement par les voies du NO et de la PGI₂, mais plutôt par la troisième voie des EDRF, celle des EDHF. Pour vérifier ces hypothèses, il serait pertinent d'une part, de quantifier la libération de PGI₂ et de NO en présence d'ET-1. Si notre hypothèse est juste, cette libération devrait être diminuée chez les souris KO. Une étude a révélé que chez des souris MK2^{-/-}, la relâche de NO était significativement diminuée après une infection à une endotoxine (Kotlyarov *et al.* 1999). D'autre part, il serait également intéressant d'incuber les artères avec des inhibiteurs des canaux potassiques et observer l'impact des EDHF dans la réponse vasculaire. Bref, nous avons observé, à l'aide de ces inhibiteurs, que MK2 serait impliqué dans la réponse contractile à l'ET-1 par l'action du NO et de la PGI₂, c'est pourquoi nous n'observons donc pas de conséquences d'une inhibition de l'un ou l'autre de ces agents vasorelaxant chez les souris déficientes en MK2.

5.7 La vasodilatation NO-dépendante

Puisque l'inhibition de la eNOS par le L-NNA n'avait pas d'effet sur la réponse vasculaire à l'ET-1 dans les souris MK2^{-/-} (Fig. 13C), nous avons décidé d'étudier la réponse vasodilatatrice NO-dépendante, par l'ajout d'ACh. Ce

neurotransmetteur se lie aux récepteurs muscariniques et induit la relâche de NO par la NO synthase (Fig. 2). Ni la puissance, ni la sensibilité à l'ACh n'est altérée dans les artères provenant de souris MK2^{-/-}: elles dilatent aussi bien que les artères provenant de souris contrôles (Fig. 14A). Cette observation n'est cependant pas étonnante puisque nous sommes en condition saine où la biodisponibilité du NO n'est pas altérée. Néanmoins, en présence de L-NNA, les souris MK2^{-/-} semblent démontrer une tendance, statistiquement non significative, à être plus susceptibles à l'inhibiteur de la eNOS (Fig. 14B). Nos résultats ne permettent pas de démontrer un lien entre MK2 et la dilatation initiée par l'ACh. Nous ne pouvons cependant pas écarter la possibilité que dans des conditions mimant le développement de pathologies, processus au cours duquel la biodisponibilité du NO est diminuée, les souris MK2^{-/-} pourraient être moins adaptées à répondre aux divers stimuli.

6. Conclusions

Notre étude chez les souris transgéniques MK2^{-/-} a permis de révéler des rôles intéressants de MK2 notamment *in vivo*. Nous avons aussi révélé quelques indices se rapportant au rôle de MK2 dans l'activation des diverses voies vasculaires par l'ET-1: d'une part dans la régulation de gènes impliqués dans le maintien du tonus vasculaire et d'autre part, d'un côté plus fonctionnel, dans la réponse vasomotrice d'artères isolées en réponse à différents stimuli et inhibiteurs.

Le modèle que nous avons choisi d'utiliser s'est avéré plus complexe qu'imaginé au départ. En effet, avec le vaste éventail de fonctions cellulaires associées à MK2 et l'existence de kinases « jumelles » qui rend possible l'instauration d'un mécanisme de compensation, il n'est pas facile d'isoler et de caractériser des mécanismes de manière exclusive. Il aurait été sans doute plus simple et plus spécifique de travailler avec des cellules en culture transfectées avec un ARN interférant. Cependant, avec la complexité vient également la pertinence de l'étude. Le modèle animal MK2^{-/-} est plus complet et permet une vision plus physiologique. Ainsi, des cibles potentielles de médicaments pourraient faire surface: il serait peut-être possible de reproduire les effets bénéfiques sur la fonction cardiaque retrouvés chez les souris MK2^{-/-} par le développement d'inhibiteurs de MK2.

6.1 Faiblesses et approches alternatives

Notre étude comporte certaines limitations et peuvent soulever certaines questions concernant la méthodologie utilisée ou l'interprétation de certains résultats. D'abord, l'expérience à l'actinomycine D (Fig. 12) n'a été réalisée que sur des cellules provenant de souris MK2^{+/+} et visait à déterminer le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la variation des niveaux d'ARNm (stabilité *vs.* synthèse *de novo*). Toutefois chez les souris MK2^{-/-}, il serait possible que le mécanisme de régulation soit différent en absence de MK2. Ainsi, il serait pertinent de répéter l'expérience avec des cellules provenant de souris transgéniques afin de confirmer qu'un même mécanisme de régulation est utilisé pour les deux génotypes. Ensuite, l'étude de l'implication des COX dans la réactivité vasculaire à l'ET-1 a été effectuée avec un inhibiteur non sélectif, l'indométacine (Fig. 13). Cependant, une telle méthode inhibe à la fois la production de la prostacycline et du thromboxane, des eicosanoïdes ayant des effets opposés sur la réponse vasculaire et on masque ainsi les effets propres à l'un ou l'autre de ces facteurs. En réponse, il serait possible d'utiliser une approche alternative en inhibant sélectivement soit les COX ou les eicosanoïdes synthèses. Ceci permettrait d'étudier spécifiquement les rôles de la prostacycline et du thromboxane sur la réponse vasculaire à l'ET-1.

7. Références

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. New York: Garland Science.
- Alcaide P, Fresno M (2004). AgC10, a mucin from *Trypanosoma cruzi*, destabilizes TNF and cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Eur J Immunol.* **34**, 1695-1704.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T (1994). Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J.* **302 (Pt 3)**, 723-727.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* **348**, 730-732.
- Arehart E, Stitham J, Asselbergs FW, Douville K, MacKenzie T, Fetalvero KM, Gleim S, Kasza Z, Rao Y, Martel L, Segel S, Robb J, Kaplan A, Simons M, Powell RJ, Moore JH, Rimm EB, Martin KA, Hwa J (2008). Acceleration of cardiovascular disease by a dysfunctional prostacyclin receptor mutation: potential implications for cyclooxygenase-2 inhibition. *Circ Res.* **102**, 986-993.
- Barman SA, Marrero MB (2005). Mechanism of endothelin-1 activation of MAP kinases in neonatal pulmonary vascular smooth muscle. *Lung.* **183**, 425-439.
- Basso N, Terragno NA (2001). History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* **38**, 1246-1249.
- Berdeaux A (2007). Preclinical results with I(f) current inhibition by ivabradine. *Drugs.* **67 Suppl 2**, 25-33.
- Bernstein P, Peltz SW, Ross J (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol.* **9**, 659-670.
- Bollig F, Winzen R, Kracht M, Ghebremedhin B, Ritter B, Wilhelm A, Resch K, Holtmann H (2002). Evidence for general stabilization of mRNAs in response to UV light. *Eur J Biochem.* **269**, 5830-5839.
- Boulanger C, Luscher TF (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest.* **85**, 587-590.
- Boutaud O, Dixon DA, Oates JA, Sawaoka H (2003). Tristetraprolin binds to the COX-2 mRNA 3' untranslated region in cancer cells. *Adv Exp Med Biol.* **525**, 157-160.
- Braun-Menendez E, Page IH (1958). Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science.* **127**, 242.
- Bremnes T, Paasche JD, Mehllum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H (2000). Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem.* **275**, 17596-17604.
- Brennan CM, Steitz JA (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci.* **58**, 266-277.
- Brewer G (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol.* **11**, 2460-2466.
- Cain AE, Tanner DM, Khalil RA (2002). Endothelin-1--induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent [Ca(2+)](i) sensitization pathways. *Hypertension.* **39**, 543-549.

- Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A (2009). Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways. *Endocrinology*. **150**, 3128-3137.
- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Rajmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*. **107**, 451-464.
- Chen D, Balyakina EV, Lawrence M, Christman BW, Meyrick B (2003). Cyclooxygenase is regulated by ET-1 and MAPKs in peripheral lung microvascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **284**, L614-621.
- Cohen P (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol*. **7**, 353-361.
- Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett*. **364**, 229-233.
- Culbert AA, Skaper SD, Howlett DR, Evans NA, Facci L, Soden PE, Seymour ZM, Guillot F, Gaestel M, Richardson JC (2006). MAPK-activated protein kinase 2 deficiency in microglia inhibits pro-inflammatory mediator release and resultant neurotoxicity. Relevance to neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. **281**, 23658-23667.
- Davie NJ, Schermuly RT, Weissmann N, Grimminger F, Ghofrani HA (2009). The science of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future studies. *Eur J Clin Invest*. **39 Suppl 2**, 38-49.
- de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**, 9797-9800.
- Dessy C, Kim I, Sougnéz CL, Laporte R, Morgan KG (1998). A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol*. **275**, C1081-1086.
- Di Mari JF, Saada JJ, Mifflin RC, Valentich JD, Powell DW (2007). HETEs enhance IL-1-mediated COX-2 expression via augmentation of message stability in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **293**, G719-728.
- Diaz A, Bourassa MG, Guertin MC, Tardif JC (2005). Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. *Eur Heart J*. **26**, 967-974.
- Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2001). Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest*. **108**, 1657-1665.
- Drouin A, Thorin-Trescases N, Hamel E, Falck JR, Thorin E (2007). Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H2O2 production in mouse cerebral arteries. *Cardiovasc Res*. **73**, 73-81.

- Eckert RL, Efimova T, Balasubramanian S, Crish JF, Bone F, Dashti S (2003). p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J Invest Dermatol.* **120**, 823-828.
- Ehltling C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, Ludwig S, Blackshear PJ, Gaestel M, Haussinger D, Bode JG (2007). Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol.* **178**, 2813-2826.
- Farhat N, Matouk CC, Mamarbachi AM, Marsden PA, Allen BG, Thorin E (2008). Activation of ETB receptors regulates the abundance of ET-1 mRNA in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* **153**, 1420-1431.
- Feletou M, Vanhoutte PM (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* **117**, 139-155.
- Fosslien E (2005). Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Clin Lab Sci.* **35**, 347-385.
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* **78**, 1039-1049.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M (1994). Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **199**, 1461-1465.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**, 373-376.
- Gaestel M (2006). MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 120-130.
- Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A, Lotersztajn S (1998). Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* **273**, 23183-23190.
- Ganz P, Creager MA, Fang JC, McConnell MV, Lee RT, Libby P, Selwyn AP (1996). Pathogenic mechanisms of atherosclerosis: effect of lipid lowering on the biology of atherosclerosis. *Am J Med.* **101**, 4A10S-16S.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 113-126.
- Gendron ME, Thorin-Trescases N, Villeneuve L, Thorin E (2007). Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **292**, H451-458.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ (1993). Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* **328**, 1732-1739.
- Gilbert P, Thorin E (2003). Endothelin-1 limits vascular smooth muscle beta-adrenergic receptor sensitivity by a PKC-dependent pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* **42**, 534-538.
- Gilbert P, Tremblay J, Thorin E (2001). Endothelium-derived endothelin-1 reduces cerebral artery sensitivity to nitric oxide by a protein kinase C-independent pathway. *Stroke.* **32**, 2351-2355.

- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW (1934). Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.* **59**, 347-379.
- Gryglewski RJ (2008). Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep.* **60**, 3-11.
- Gryglewski RJ, Bunting S, Moncada S, Flower RJ, Vane JR (1976). Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. *Prostaglandins.* **12**, 685-713.
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975). Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**, 2994-2998.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* **265**, 808-811.
- Hegen M, Gaestel M, Nickerson-Nutter CL, Lin LL, Telliez JB (2006). MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol.* **177**, 1913-1917.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* **248**, C550-556.
- Hitti E, Iakovleva T, Brook M, Deppenmeier S, Gruber AD, Radzioch D, Clark AR, Blackshear PJ, Kotlyarov A, Gaestel M (2006). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol.* **26**, 2399-2407.
- Hla T, Neilson K (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**, 7384-7388.
- Hsu YH, Chen JJ, Chang NC, Chen CH, Liu JC, Chen TH, Jeng CJ, Chao HH, Cheng TH (2004). Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. *J Vasc Res.* **41**, 64-74.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* **377**, 239-242.
- Hunley TE, Kon V (2001). Update on endothelins - biology and clinical implications. *Pediatr Nephrol.* **16**, 752-762.
- Iniguez MA, Cacheiro-Llaguno C, Cuesta N, Diaz-Munoz MD, Fresno M (2008). Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem.* **114**, 201-209.
- Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest.* **92**, 398-403.
- Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, Kon V (1995). Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem.* **270**, 6997-7003.

- Jagavelu K, Tietge UJ, Gaestel M, Drexler H, Schieffer B, Bavendiek U (2007). Systemic deficiency of the MAP kinase-activated protein kinase 2 reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circ Res.* **101**, 1104-1112.
- Jang BC, Sanchez T, Schaefer HJ, Trifan OC, Liu CH, Creminon C, Huang CK, Hla T (2000). Serum withdrawal-induced post-transcriptional stabilization of cyclooxygenase-2 mRNA in MDA-MB-231 mammary carcinoma cells requires the activity of the p38 stress-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **275**, 39507-39515.
- Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D, Ducimetiere P (2005). Heart-rate profile during exercise as a predictor of sudden death. *N Engl J Med.* **352**, 1951-1958.
- Kawamura H, Otsuka T, Matsuno H, Niwa M, Matsui N, Kato K, Uematsu T, Kozawa O (1999). Endothelin-1 stimulates heat shock protein 27 induction in osteoblasts: involvement of p38 MAP kinase. *Am J Physiol.* **277**, E1046-1054.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **41**, 851-876.
- Kim B, Kim J, Bae YM, Cho SI, Kwon SC, Jung JY, Park JC, Ahn HY (2004). p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the diminished aortic contraction by endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension.* **43**, 1086-1091.
- Kim J, Lee YR, Lee CH, Choi WH, Lee CK, Bae YM, Cho S, Kim B (2005). Mitogen-activated protein kinase contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* **514**, 209-215.
- Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, Selwyn AP, Ganz P (2001). Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.* **104**, 1114-1118.
- Kotlyarov A, Gaestel M (2002). Is MK2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) the key for understanding post-transcriptional regulation of gene expression? *Biochem Soc Trans.* **30**, 959-963.
- Kotlyarov A, Neining A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, Gaestel M (1999). MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat Cell Biol.* **1**, 94-97.
- Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, Lin LL, Gaestel M (2002). Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol.* **22**, 4827-4835.
- Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, Faller DV (1993). Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest.* **92**, 99-104.
- Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **2**, 717-726.
- Kwon S, Fang LH, Kim B, Ha TS, Lee SJ, Ahn HY (2004). p38 Mitogen-activated protein kinase regulates vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* **95**, 267-272.
- Kwon S, Lee WJ, Fang LH, Kim B, Ahn HY (2003). Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *J Vet Med Sci.* **65**, 225-230.

- Labonte J, Brochu I, Simard E, D'Orleans-Juste P (2008). Distinct modulation of the endothelin-1 pathway in iNOS^{-/-} and eNOS^{-/-} mice. *Can J Physiol Pharmacol.* **86**, 516-525.
- Labonte J, D'Orleans-Juste P (2004). Enhanced or repressed pressor responses to endothelin-1 or IRL-1620, respectively, in eNOS knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* **44 Suppl 1**, S109-112.
- Lechat P, Hulot JS, Escolano S, Mallet A, Leizorovicz A, Werhlen-Grandjean M, Pochmalicki G, Dargie H (2001). Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II Trial. *Circulation.* **103**, 1428-1433.
- Lee HM, Won KJ, Kim J, Park HJ, Kim HJ, Roh HY, Lee SH, Lee CK, Kim B (2007). Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* **103**, 427-433.
- Loflin P, Chen CY, Shyu AB (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* **13**, 1884-1897.
- Maitra S, Chou CF, Lubner CA, Lee KY, Mann M, Chen CY (2008). The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *RNA.* **14**, 950-959.
- Masaki T (1994). Endothelin in vascular biology. *Ann N Y Acad Sci.* **714**, 101-108.
- Mawji IA, Robb GB, Tai SC, Marsden PA (2004). Role of the 3'-untranslated region of human endothelin-1 in vascular endothelial cells. Contribution to transcript lability and the cellular heat shock response. *J Biol Chem.* **279**, 8655-8667.
- McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR (1996). Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* **271**, 8488-8492.
- Metra M, Torp-Pedersen C, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Komajda M, Remme WJ, Lutiger B, Scherhag A, Lukas MA, Charlesworth A, Poole-Wilson PA (2005). Influence of heart rate, blood pressure, and beta-blocker dose on outcome and the differences in outcome between carvedilol and metoprolol tartrate in patients with chronic heart failure: results from the COMET trial. *Eur Heart J.* **26**, 2259-2268.
- Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N, Dupuis J (2005). Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* **171**, 506-513.
- Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL (1997). A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev.* **11**, 1023-1036.
- Mitsutomi N, Akashi C, Odagiri J, Matsumura Y (1999). Effects of endogenous and exogenous nitric oxide on endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* **364**, 65-73.
- Miyauchi T, Masaki T (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* **61**, 391-415.

- Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J (2000). Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*. **525 Pt 3**, 761-770.
- Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ (2001). Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*. **286**, 954-959.
- Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ (2002). The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev*. **7**, 407-422.
- Nakov R, Pfarr E, Eberle S (2002). Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens*. **15**, 583-589.
- Neininger A, Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk HD, Holtmann H, Kollias G, Gaestel M (2002). MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem*. **277**, 3065-3068.
- Newton R, Seybold J, Liu SF, Barnes PJ (1997). Alternate COX-2 transcripts are differentially regulated: implications for post-transcriptional control. *Biochem Biophys Res Commun*. **234**, 85-89.
- Nieminen R, Vuolteenaho K, Riutta A, Kankaanranta H, van der Kraan PM, Moilanen T, Moilanen E (2008). Aurothiomalate inhibits COX-2 expression in chondrocytes and in human cartilage possibly through its effects on COX-2 mRNA stability. *Eur J Pharmacol*. **587**, 309-316.
- O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF (1987). Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol*. **132**, 263-270.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*. **274**, 32248-32257.
- Okajima M, Parent R, Thorin E, Lavallee M (2004). Pathophysiological plasma ET-1 levels antagonize beta-adrenergic dilation of coronary resistance vessels in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **287**, H1476-1483.
- Ono K, Han J (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. **12**, 1-13.
- Ortega Mateo A, de Artinano AA (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*. **36**, 339-351.
- Pearson LJ, Yandle TG, Nicholls MG, Evans JJ (2008). Regulation of endothelin-1 release from human endothelial cells by sex steroids and angiotensin-II. *Peptides*. **29**, 1057-1061.
- Peng H, Chen P, Cai Y, Chen Y, Wu QH, Li Y, Zhou R, Fang X (2008). Endothelin-1 increases expression of cyclooxygenase-2 and production of interleukin-8 in human pulmonary epithelial cells. *Peptides*. **29**, 419-424.
- Pepine CJ (2009). The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *Am J Med*. **122**, S10-15.
- Piper PJ, Vane JR (1969). Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Nature*. **223**, 29-35.
- Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-

- activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* **270**, 7420-7426.
- Rao P, Knaus EE (2008). Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* **11**, 81s-110s.
- Rapoport RM, Williams SP (1996). Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension.* **28**, 64-75.
- Rebsamen MC, Capoccia R, Vallotton MB, Lang U (2003). Role of cyclooxygenase 2, p38 and p42/44 MAPK in the secretion of prostacyclin induced by epidermal growth factor, endothelin-1 and angiotensin II in rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **35**, 81-89.
- Reimunde FM, Castanares C, Redondo-Horcajo M, Lamas S, Rodriguez-Pascual F (2005). Endothelin-1 expression is strongly repressed by AU-rich elements in the 3'-untranslated region of the gene. *Biochem J.* **387**, 763-772.
- Ronkina N, Kotlyarov A, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Hitti E, Milarski K, Askew R, Marusic S, Lin LL, Gaestel M, Telliez JB (2007). The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Mol Cell Biol.* **27**, 170-181.
- Ronkina N, Kotlyarov A, Gaestel M (2008). MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? *Front Biosci.* **13**, 5511-5521.
- Ross J (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* **59**, 423-450.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* **78**, 1027-1037.
- Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene.* **15**, 2169-2177.
- Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**, 320-344.
- Rubanyi GM, Polokoff MA (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* **46**, 325-415.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* **250**, H822-827.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G (2002). Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* **346**, 896-903.
- Rubin LJ, Roux S (2002). Bosentan: a dual endothelin receptor antagonist. *Expert Opin Investig Drugs.* **11**, 991-1002.
- Rufanova VA, Pozdnev VF, Kalenikova EI, Postnikov AB, Storozhilova AN, Masenko VP, Gomazkov OA, Medvedev OS, Medvedeva NA (2009). Endothelin-converting enzyme inhibition in the rat model of acute heart failure: heart function and neurohormonal activation. *Exp Biol Med (Maywood).*

- Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F (1992). Endothelin-1 stimulates its own synthesis in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **188**, 286-291.
- Saito S, Hirata Y, Imai T, Marumo F (1995). Autocrine regulation of the endothelin-1 gene in rat endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S84-87.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* **348**, 732-735.
- Sanchez R, MacKenzie A, Farhat N, Nguyen TD, Stewart DJ, Mercier I, Calderone A, Thorin E (2002). Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *J Cardiovasc Pharmacol.* **39**, 652-659.
- Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O (1996). Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 13176-13181.
- Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Lusis AJ (2000). Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation.* **102**, 75-81.
- Shiroto K, Otani H, Yamamoto F, Huang CK, Maulik N, Das DK (2005). MK2-/- gene knockout mouse hearts carry anti-apoptotic signal and are resistant to ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* **38**, 93-97.
- Skrbic R, Igic R (2009). Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides.*
- Smyth EM, FitzGerald GA (2002). Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm.* **65**, 149-165.
- Sokolovsky M (1995). Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol Ther.* **68**, 435-471.
- Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, Gaestel M (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**, 307-313.
- Su X, Ao L, Zou N, Song Y, Yang X, Cai GY, Fullerton DA, Meng X (2008). Post-transcriptional regulation of TNF-induced expression of ICAM-1 and IL-8 in human lung microvascular endothelial cells: an obligatory role for the p38 MAPK-MK2 pathway dissociated with HSP27. *Biochim Biophys Acta.* **1783**, 1623-1631.
- Syeda F, Tullis E, Slutsky AS, Zhang H (2008). Human neutrophil peptides upregulate expression of COX-2 and endothelin-1 by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **294**, H2769-2774.
- Tang EH, Vanhoutte PM (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics.* **32**, 409-418.
- ter Haar E, Prabhakar P, Liu X, Lepre C (2007). Crystal structure of the p38 alpha-MAPKAP kinase 2 heterodimer. *J Biol Chem.* **282**, 9733-9739.
- Thomas T, Timmer M, Cesnulevicius K, Hitti E, Kotlyarov A, Gaestel M (2008). MAPKAP kinase 2-deficiency prevents neurons from cell death by reducing neuroinflammation--relevance in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* **105**, 2039-2052.

- Thorin E, Cernacek P, Dupuis J (1998a). Endothelin-1 regulates tone of isolated small arteries in the rat: effect of hyperendothelinemia. *Hypertension*. **31**, 1035-1041.
- Thorin E, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J (2000). Role of ET(A) receptors in the regulation of vascular reactivity in rats with congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **279**, H844-851.
- Thorin E, Nguyen TD, Bouthillier A (1998b). Control of vascular tone by endogenous endothelin-1 in human pial arteries. *Stroke*. **29**, 175-180.
- Thorin E, Parent R, Ming Z, Lavallee M (1999). Contribution of endogenous endothelin to large epicardial coronary artery tone in dogs and humans. *Am J Physiol*. **277**, H524-532.
- Tigerstedt R, Bergman PG (1898). Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol*. **8**, 223-271.
- Vanhoutte PM (2000). Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst*. **81**, 271-277.
- Vanhoutte PM (2004). Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res*. **49**, 503-508.
- Vanhoutte PM (2009a). COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther*. **86**, 212-215.
- Vanhoutte PM (2009b). How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **29**, 1156-1160.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S (2005). Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. **144**, 449-458.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*. **128**, 662-671.
- Wang X, Xu L, Wang H, Young PR, Gaestel M, Feuerstein GZ (2002). Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice. *J Biol Chem*. **277**, 43968-43972.
- White A, Pargellis CA, Studts JM, Werneburg BG, Farmer BT, 2nd (2007). Molecular basis of MAPK-activated protein kinase 2:p38 assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 6353-6358.
- Williams JS, Williams GH (2003). 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. **88**, 2364-2372.
- Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J*. **18**, 4969-4980.
- Xiao YQ, Malcolm K, Worthen GS, Gardai S, Schiemann WP, Fadok VA, Bratton DL, Henson PM (2002). Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. **277**, 14884-14893.
- Xu CB, Zheng JP, Zhang W, Zhang Y, Edvinsson L (2008). Lipid-soluble smoke particles upregulate vascular smooth muscle ETB receptors via activation of mitogen-activating protein kinases and NF-kappaB pathways. *Toxicol Sci*. **106**, 546-555.

- Yakubu MA, Leffler CW (2005). Regulation of cerebral microvascular endothelial cell cyclooxygenase-2 message and activity by blood derived vasoactive agents. *Brain Res Bull.* **68**, 150-156.
- Yamakaw K, Kitamura K, Nonoguchi H, Takasu N, Miller RT, Tomita K (2002). Galpha13 induces preproET-1 gene expression via JNK. *Hypertens Res.* **25**, 427-432.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **332**, 411-415.
- Zhao W, Liu M, Kirkwood KL (2008). p38alpha stabilizes interleukin-6 mRNA via multiple AU-rich elements. *J Biol Chem.* **283**, 1778-1785.
- Zhou Y, Mitra S, Varadharaj S, Parinandi N, Zweier JL, Flavahan NA (2006). Increased expression of cyclooxygenase-2 mediates enhanced contraction to endothelin ETA receptor stimulation in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Circ Res.* **98**, 1439-1445.

