



Université de Montréal

**Étude de la polyubiquitination en lysine 63 dans les effets  
proinflammatoires de l'angiotensine II *in vitro***

par

Myriam St-Amant Verret

Département de Pharmacie

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Janvier 2010

© Myriam St-Amant Verret, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude de la polyubiquitination en lysine 63 dans les effets proinflammatoires de  
l'angiotensine II *in vitro*

Présenté par :  
Myriam St-Amant Verret

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lamontagne, président-rapporteur  
Dr. Marc Servant, directeur de recherche  
Dr. Denis Deblois, membre du jury

## Résumé

Les évidences scientifiques révèlent l'implication des actions proinflammatoires de l'angiotensine II (Ang II) dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, la caractérisation des bases moléculaires de l'Ang II sur le tissu vasculaire n'est pas totalement élucidée. La majorité des actions de l'Ang II implique l'activation d'une variété de cascades de signalisation dont les voies *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) ; *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs), *p38 kinases* et *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) et l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B via le complexe IKK. Récemment, une nouvelle modification post-traductionnelle dans les actions de l'Ang II, soit la polyubiquitination de la sous-unité *NF- $\kappa$ B essential modulator* (NEMO) du complexe IKK, a été révélée. L'objectif de mon projet de recherche est de vérifier l'importance de la polyubiquitination en K63 tout en caractérisant les protéines impliquées dans la modification de NEMO dans des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) exposées à l'Ang II. Notre étude suggère, selon une approche siARN combinant Ubc7 et Ubc13, la diminution de la phosphorylation du complexe IKK, de Akt et des MAPKs. De plus, nos résultats illustrent l'implication de TRAF6 dans la signalisation cellulaire de l'Ang II. Finalement, notre étude révèle la présence de la polyubiquitination en K63 dans la signalisation cellulaire de l'Ang II par chromatographie d'affinité. Cette étude met en évidence l'implication de la polyubiquitination en K63 dans la signalisation de l'Ang II dans des CMLV et implique Ubc13 et Ubc7 dans le remodelage vasculaire et l'inflammation dépendante de l'Ang II dans des CMLV.

**Mots-clés :** Athérosclérose, inflammation, angiotensine II, polyubiquitination en lysine 63, Ubc13, NF- $\kappa$ B,

## Abstract

Several studies have demonstrated that the proinflammatory and growth promoting actions of Angiotensin II (Ang II) are implicated in cardiovascular disease. However, the underlying molecular mechanisms involved in Ang II actions are still not completely elucidated. Most of the known biological effects of Ang II are through the activation of several cell signaling pathways, such as the mitogen-activated protein kinase pathways (MAPKs; c-Jun N-terminal kinases (JNKs), p38 kinases and extracellular signal-regulated kinases (ERK)), and nuclear factor kappaB transcription factor (NF- $\kappa$ B) pathway by IKK complex activation. Recently, another post-translational modification, polyubiquitination of the IKK complex sub-unit *NF- $\kappa$ B essential modulator* (NEMO) has been demonstrated to be implicated in Ang II signaling. The objective of my research project was to illustrate the importance of K63-linked polyubiquitination, and characterizing the proteins involved in the modification of NEMO in vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to Ang II. Using siRNA, we show that Ubc7 and Ubc13 together are involved in MAPK, IKK and Akt phosphorylation in VSMC exposed to Ang II. Moreover, our results show that TRAF6, a ubiquitin ligase, is involved in Ang II signaling. Finally, our study reveals involvement of K63-linked polyubiquitination in Ang II signaling by chromatography affinity. Here, we report K63-linked polyubiquitination involvement in Ang II signaling and also identify Ubc7 and Ubc13 as a ubiquitin conjugating enzymes involved in MAPKs, ERK and NF- $\kappa$ B signalling pathway suggesting a role of these proteins in Ang II-dependent vascular remodelling and proinflammatory effects in VSMC.

**Keywords** : Atherosclerosis, inflammation, angiotensin II, K63-linked polyubiquitination, Ubc13, NF- $\kappa$ B,

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xv
Chapitre I : Introduction.....	1
1.1 Incidence des maladies cardiovasculaires.....	1
1.2 Composition des parois vasculaires.....	1
1.2.1 Composition macroscopique.....	1
1.2.2 Composition cellulaire.....	3
1.2.2.1 Cellules endothéliales.....	3
1.2.2.2 Cellules musculaires lisses vasculaires.....	3
1.2.2.3 Matrice extracellulaire.....	4
1.3 Athérosclérose.....	4
1.3.1 Étapes précoces - Formation de la strie lipidique.....	6
1.3.1.1 Rôles physiologiques et production des lipoprotéines.....	6
1.3.1.2 Accumulation et modification des lipides.....	8
1.3.1.3 Recrutement des leucocytes circulants.....	9
1.3.2 Étapes intermédiaires – Formation de la plaque fibreuse.....	11
1.3.3 Étapes critiques – Formation du cap fibreux et rupture de la plaque.....	11
1.3.4 Facteurs de risque.....	13
1.3.4.1 Facteurs génétiques.....	13
1.3.4.2 Facteurs environnementaux.....	15
1.3.5 Traitements disponibles.....	16
1.4 Le système rénine angiotensine.....	18
1.4.1 Système circulatoire.....	18

1.4.2	Système tissulaire.....	18
1.4.3	Rôles physiologiques du système rénine angiotensine .....	20
1.5.	Les récepteurs de l'angiotensine II .....	21
1.5.1	Morphologie des récepteurs de l'Ang II .....	21
1.5.2	Distribution tissulaire et régulation de l'expression des sous-types de récepteurs .....	22
1.5.3	Désensibilisation et internalisation du récepteur AT1 .....	23
1.5.4	Signalisation du récepteur AT1 .....	24
1.6	Effets pathophysiologiques de l'Ang II dans le développement de l'athérosclérose .....	29
1.7	Ubiquitination .....	31
1.7.1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine – E1 .....	34
1.7.2	Enzymes de conjugaison de l'ubiquitine – E2 .....	35
1.7.3	Enzyme ubiquitine ligase – E3 .....	36
1.7.4	Deubiquitinases - DUB .....	37
1.6.5	Pathologies associées au système d'ubiquitination.....	38
1.8	Facteur de transcription NF- $\kappa$ B .....	40
1.8.1	Activation de NF- $\kappa$ B.....	41
1.8.1.1	Voie d'activation classique de NF- $\kappa$ B .....	41
1.8.1.2	Voie d'activation alternative de NF- $\kappa$ B.....	41
1.8.1.3	Voie d'activation atypique de NF- $\kappa$ B.....	42
1.8.2	Activation du complexe IKK .....	43
1.8.2.1	Composants et formation du complexe IKK .....	43
1.8.2.2	Activation du complexe IKK.....	45
1.8.2.2.1	Voie d'activation du complexe IKK dans le système immunitaire .....	46
1.8.2.2.1.1	Activation du complexe IKK via le TNFR.....	46
1.8.2.2.1.2	Voie d'activation du complexe IKK via l'IL-1 $\beta$ R.....	47
1.8.2.2.1.3	Voie d'activation du complexe IKK via le TCR .....	48
1.8.2.2.2	Voie d'activation du complexe IKK par un GPCR .....	49
1.8.2.2.2.1	Voie d'activation du complexe IKK via le récepteur du LPA.....	49

1.8.2.2.2 Voie d'activation du complexe IKK par le récepteur AT1 de l'Ang II.....	51
1.8.3 Caractéristiques de TRAF6.....	52
1.8.4 Caractéristiques d'Ubc13.....	53
1.9 Hypothèses et objectifs.....	54
1.9.1 Objectif 1 – Implication de la protéine Ubc13 dans les voies de l'Ang II.....	55
1.9.2 Objectif 2 – Implication de la protéine TRAF6 dans les voies de l'Ang II.....	56
1.9.3 Objectif 3 – Étude de la polyubiquitination en K63 dans les voies de l'Ang II	56
Chapitre II : Matériels et méthodes.....	59
Chapitre III : Résultats.....	68
3.1 : Objectif 1 – Implication de la protéine Ubc13 dans les voies de l'Ang II.....	68
3.2 Objectif 2 : Implication de la protéine TRAF6 dans les voies de l'Ang II.....	80
3.3 Objectif 3 : Étude de la polyubiquitination en K63 dans les voies de l'Ang II.....	87
Chapitre IV : Discussion.....	91
Conclusion.....	105
Bibliographie.....	106



## Liste des figures

Figure 1 : <b>Composition macroscopique de l'artère.</b> Figure modifiée de (Libby, 2002).....	2
Figure 2 : <b>Développement de l'athérosclérose.</b> Figure modifiée de (Libby, 2002; Sanz and Fayad, 2008). .....	5
Figure 3 : <b>Signalisation du AT1R suite à la liaison de son ligand, l'Ang II.</b> Figure modifiée de (Mehta and Griendling, 2007).....	29
Figure 4 : <b>Représentation schématique du processus d'ubiquitination.</b> La figure trois dimensions de l'ubiquitine est tirée de (Raasi, 2009) La distinction entre les E3 RING et HECT est décrite à la section 1.7.3 .....	34
Figure 5 : .....	43
Figure 6 : <b>Protéines effectrices impliquées dans l'activation du complexe IKK selon divers ligands.</b> A) TNFR B) IL-1R C) TCR, D) GPCR du LPA.....	51
Figure 7 : <b>Schéma représentatif des objectifs de recherche.</b> .....	57
Figure 8 : <b>Représentation schématique du protocole permettant la production de population stables de CMLV shUbc13 par infection lentivirale (A) tel que décrit ci-haut et processus cellulaire menant à la dégradation d'un ARN messager spécifique par shARN (B).</b> .....	63
Figure 9 : <b>L'Ang II induit la phosphorylation de IKK, de Akt et des MAPKs ERK1/2, JNK et p38 dans des CMLV de rat.</b> .....	69
Figure 10 : <b>La diminution de l'expression protéique d'Ubc13 n'a pas d'effet sur l'activation des voies MAPKs par phosphoblot dans des CMLV exposées à l'Ang II, à l'exception de la population 35.</b> .....	71
Figure 11 : <b>La population de CMLV shUbc13 #35 démontre l'implication d'Ubc13 dans l'activation des MAPKs ERK1/2 et JNK et dans la synthèse protéique.</b> .....	75
Figure 12 : <b>Ubc13 n'est pas impliqué dans la phosphorylation des MAPKs et du complexe IKK dans des CMLV exposées à l'Ang II par l'utilisation de siARN.</b> ...76	

Figure 13 : Ubc7 et Ubc13 ensemble sont impliquées dans la phosphorylation des MAPKs, de Akt et du complexe IKK dans des CMLV exposées à l'Ang II, par l'utilisation de siARN.....	80
Figure 14 : Induction de gènes rapporteurs luciférase sous le contrôle des promoteurs 73-collagénase (A) ou PRDII (B) à des doses croissantes de TRAF6 dans des 293Ad5 exposées à l'Ang II. ....	83
Figure 15 : Induction de gènes rapporteurs luciférase sous contrôle des promoteurs 73-collagénase (A) ou PRDII (B) à des doses croissantes d'Ubc13 dans des 293Ad5 traitées à l'Ang II. ....	85
Figure 16 : Induction de gènes rapporteurs luciférase sous contrôle du promoteur 73-collagénase en présence de TRAF6 et d'Ubc13 dans des 293Ad5 exposées à l'Ang II. ....	86
Figure 17 : L'anticorps anti-ubiquitine K63 est spécifique.....	88
Figure 18 : L'Ang II induit la polyubiquitination en K63 de certaines protéines. ....	90
Figure 19 : Schéma du vecteur pcDNA3.1 His (Invitrogen, 2009) dans lequel le gène ubiquitine K63 est inséré.....	103

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la production des plasmides FLAG-TRAF6 et MYC-Ubc13 ainsi que ceux utilisés pour la mutagenèse dirigée de l'ubiquitine.....</b>	<b>61</b>
<b>Tableau II : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la construction du mutant TRAF6C70A.....</b>	<b>101</b>

## Liste des abréviations

**AA** : acide arachidonique

**ACE** : enzyme de conversion de l'Ang II

**ACTH** : hormone *adrenocorticotropin*

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AGT** : angiotensinogene

**Akt** : protéine kinase B

**AMP** : adénosine monophosphate

**Ang I** : angiotensine I (décapeptide 1-10)

**Ang II** : angiotensine II (octapeptide 1-8)

**Ang III** : angiotensine III (fragment 1-7)

**Ang IV** : angiotensine IV (fragment 3-7)

**AP-1** : activator protein-1

**AP-2** : protéine adaptatrice 2

**Apo** : apolipoprotéine

**ARB** : bloqueurs du récepteur à l'Ang II

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**ASK-1** : apoptosis signal regulating kinase 1

**AT\*R** : récepteur de l'angiotensine de type \*

**AVC** : accident vasculaire cérébral

**BARD1** : BRCA1-associated ring domain protein 1

**BCA** : bicinchoninic acid

**BRCA1** : breast cancer 1

**C ou Cys** : cystéine

**Ca<sup>2+</sup>** : calcium

**CAM** : calmoduline

**CARD** : caspase recruitment domain

**Carma** : caspase recruitment domain membrane-associated gyanylate kinase  
**Cbl** : Casitas B-lineage lymphoma protooncogene  
**CBP** : CREB-binding protein  
**cIAPs** : cellular inhibitor of apoptosis protein  
**CMH** : complexe majeure d'histocompatibilité  
**CMLV** : cellules musculaires lisses vasculaires  
**COX-\*** : cyclooxygénase-\*  
**CRP** : C-reactive protein  
**CYLD** : cyclindromatosis tumor suppressor protein  
**DAG** : diacylglycérol  
**DD** : dead domain  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagles Medium  
**DUB** : deubiquitinase  
**E1** : enzyme activatrice de l'ubiquitine  
**E2** : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine  
**E3** : enzyme ubiquitine ligase  
**EGF** : epidermal growth factor  
**EGFR** : epidermal growth factor receptor  
**ERK 1/2** : extracellular signal regulated kinase 1 and 2  
**FAK** : focal adhesion kinase  
**FGF** : fibroblast growth factor  
**G ou Gly** : glycine  
**GDP** : guanosine diphosphate  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**GPCR** : récepteur couplé aux protéines G ou récepteur à sept passages membranaires  
**Grb2** : growth-factor-receptor-bound protein 2  
**GRK** : G protein-coupled receptor kinase  
**HAT** : histone acetyl transférase  
**HB-EGF** : heparin-binding epidermal-factor-like

**HDL** : lipoprotéine de haute densité  
**HECT**: homologous to E6AP carboxyl terminus  
**ICAM-1** : intercellular adhesion molecule  
**IκB**: inhibiteur de NF-κB  
**IKK**: complexe IκB kinase  
**IFN-γ** : chimiokines inductible interferon-γ  
**IGFR** : Insulin-like Growth Factor Receptor  
**IL** : interleukine  
**IP<sub>3</sub>** : inositol triphosphate  
**IP-10** : inducible protein 10  
**IRAP** : insulin-regulated amino peptidase receptor  
**I-TAC** : IFN-inducible T-cell α-chemoattractant  
**JAK** : Janus kinase  
**JNK** : c-Jun N-terminal kinase  
**K ou Lys** : lysine  
**KD** : kinase domain  
**KBD** : kinase binding domain  
**LDL** : lipoprotéine de basse densité  
**LPA** : lysophosphatidic acid  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**LPL** : lipoprotéine lipase  
**LZ** : leucine zipper  
**M-CSF** : macrophage colony-stimulating factor  
**MAPKs** : mitogen-activated protein kinases  
**MBP** : myelin basic protein  
**MCP-1** : monocyte chemoattractant protein-1  
**MDM2** : mouse double minute 2  
**MEC** : matrice extracellulaire  
**MEF** : mouse embryonic fibroblast

**MEK** : MAP kinase  
**Mig** : monokine induced by IFN- $\gamma$   
**MLC** : myosin light chain  
**MLCK** : myosin light chain kinase  
**MLCP** : myosin light chain phosphatase  
**MMPs** : metalloprotéinases de la matrice  
**NADPH** : nicotinamide adénine dinucleotide phosphate  
**NBD** : NEMO binding domain  
**NEMO** : NF- $\kappa$ B essential modulator  
**NF- $\kappa$ B** : facteur nucléaire kappa B  
**NIK** : NF- $\kappa$ B inducing kinase  
**NO** : monoxyde d'azote  
**O<sup>2-</sup>** : anions superoxides  
**Ox-LDL** : lipoprotéine de basse densité oxydé  
**PA** : acide phosphatidique  
**PC** : phosphatidylcholine  
**PDGF** : platelet-derived growth factor  
**PDGFR** : platelet-derived growth factor receptor  
**PDK-1** : phosphoinositide-dependent protein kinase 1  
**PH** : pleckstrin homology  
**PI3-kinase** : phosphoinositide 3-kinase  
**PIP<sub>2</sub>** : phosphatidylinositol biphosphate  
**PIP<sub>3</sub>** : phosphatidylinositol triphosphate  
**PKC** : protéine kinase C  
**PLA2** : phospholipase A2  
**PLC-\*** : phospholipase C de type \*  
**PLD** : phospholipase D  
**PMA** : phorbol myristate acetate  
**PPAR** : peroxisome proliferator activated-receptor

**PYK** : proline-rich tyrosine kinase  
**R ou Arg** : arginine  
**Raf** : MAP kinase kinase kinase  
**RAS** : système rénine-angiotensine  
**RHD** : Rel homology domain  
**RING** : really interesting new gene  
**RIP1** : receptor associated protein  
**ROS** : reactive oxygen species  
**S ou Ser** : sérine  
**SCF** : Skp1-Culin-Roc1Rbx1Hrt-1-F-box  
**siARN** : small interfering ARN  
**SH2** : Src homology  
**shARN** : short hairpin ARN  
**Shc** : SH-domain-containing protein tyrosine phosphatase  
**SRA** : scavenger receptor A  
**SDS** : sodium dodécyl sulfate  
**SFO** : organe subfornical  
**Sos** : son of sevenless  
**STAT** : signal transducers and activators of transcription protein  
**T ou Thr**: thréonine  
**T-loop** : boucle d'activation de IKK $\beta$   
**TAD** : domaine de transactivation  
**TAK1** : transforming growth factor beta-activated kinase  
**TGF- $\beta$**  : transforming growth factor beta  
**TNF** : tumor necrosis factor  
**TNFR** : tumor necrosis factor receptor  
**TRADD** : TNF receptor-associated death domain  
**TXA2** : thromboxane A2  
**TNF** : tumor necrosis factor



**TRAF** : tumor necrosis factor receptor-associated factor

**UBA** : ubiquitin-association

**UBD** : ubiquitin binding domain

**Uev** : ubiquitin E2 variant

**Ubc** : ubiquitin conjugating

**UIM** : ubiquitin interacting motifs

**VCAM-1** : vascular cell adhesion molecule-1

**VLDL** : lipoprotéine de très faible densité

**ZF** : zinc finger

## Remerciements

Je tiens sincèrement à remercier mon directeur de recherche Dr. Marc Servant pour sa disponibilité, ses nombreux conseils ainsi que la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon cheminement. Cela m'a permis de développer mes qualités de chercheur.

Je voudrais également remercier Dr. Daniel Lamontagne et Dr. Denis Deblois d'avoir accepté de corriger ce mémoire.

De plus, je voudrais remercier tous mes collègues de travail, Simon-Pierre Gravel, Annie Bibeau-Poirier, Jean-François Clément, Priscilla Doyon, Monique Arts, Tasheen Wissanji, Nidaa Chokr et Wendy Van zuijlen avec qui nous avons échangé dans un milieu de travail stimulant. Je tiens plus particulièrement à remercier Simon, Annie, JF et Prisc pour le temps qu'ils m'ont consacré lors de mes premières semaines au laboratoire.

Enfin, je tiens à remercier mon copain, Mathieu, ainsi que ma famille, France, Claude, Claudia et Mike; merci pour vos encouragements, votre amour et votre support.

# **Chapitre I : Introduction**

## **1.1 Incidence des maladies cardiovasculaires**

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des causes majeures de mortalité au Canada. En effet, près de 30% des canadiens et 32% des canadiennes sont décédés des suites de l'une de ces maladies en 2005. Cependant, le taux moyen de décès causé par ces pathologies a considérablement diminué au cours des 25 dernières années, passant de 47% en 1979 à 31% en 2005 (Statistiques Canada, 2005). Cette baisse est associée à une diminution de la consommation de tabac et à l'augmentation de la prescription de statines, des inhibiteurs pharmacologiques diminuant la concentration du cholestérol sanguin. Ces avancés scientifiques sont réalisées grâce aux recherches qui permettent d'identifier les facteurs de risques associés à ces maladies. Malgré cette baisse de décès, le coût associé aux maladies cardiovasculaires dans notre système de santé est démesuré. En effet, près de 18,5 milliards de dollars sont associés directement ou indirectement aux maladies cardiovasculaires (Santé Canada, 2008). Les recherches ciblent l'athérosclérose comme la cause primaire des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux (Lusis et al., 2004). Ainsi, la poursuite des études entreprises sur les facteurs impliqués dans le développement de l'athérosclérose est essentielle afin de permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques prévenant, de ce fait même, l'incidence et les complications des maladies cardiovasculaires.

## **1.2 Composition des parois vasculaires**

### **1.2.1 Composition macroscopique**

Les parois vasculaires sont composées d'une succession de trois couches, l'intima, la média et l'adventice accomplissant des fonctions distinctes dans le vaisseau (Figure 1, page 2). L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales tapissant la totalité des vaisseaux. Cette couche cellulaire entre en contact avec la lumière du vaisseau sanguin permettant de créer une barrière entre les composantes du sang et la paroi. La

média est la couche dominante de l'artère et elle est composée de l'empilement concentrique de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et d'une matrice extracellulaire (MEC). De plus, elle est limitée par deux composantes, la lamelle élastique interne et la lamelle élastique externe permettant de séparer chacune des couches. Les CMLV sont responsables de la contraction du vaisseau et du maintien du tonus vasculaire. L'adventice est la couche externe du vaisseau constituée de fibres de collagènes et d'élastines associées à des fibroblastes, des adipocytes, des nerfs, des vaisseaux lymphatiques et des petits vaisseaux sanguins, nommés les vasa vasorum. La fonction première de cette couche est d'assurer l'irrigation du vaisseau (Libby, 2002).

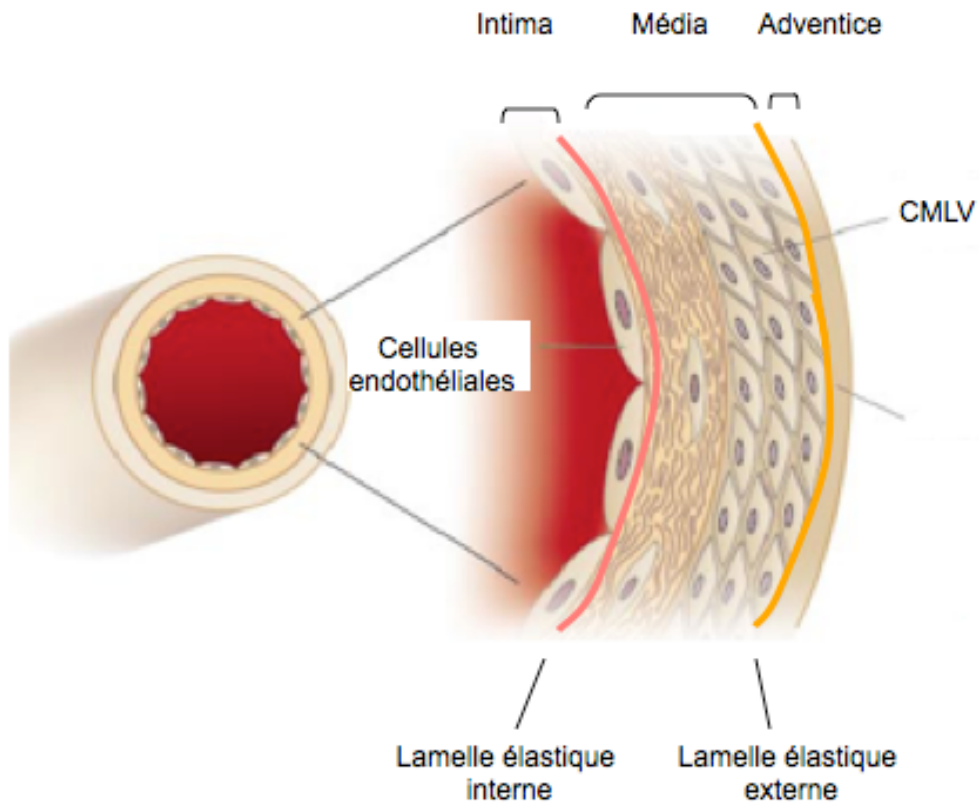


Figure 1 : **Composition macroscopique de l'artère.** Figure modifiée de (Libby, 2002)

## **1.2.2 Composition cellulaire**

Les parois des artères sont composées de nombreux types cellulaires, par contre, trois composantes sont particulièrement impliquées dans le développement de l'athérosclérose et ses complications.

### **1.2.2.1 Cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales, en plus d'assurer le rôle de barrière entre les composantes du sang et le tissu grâce à leur jonctions serrées, sont impliquées dans la sécrétion de nombreuses substances vasoactives dont le monoxyde d'azote (NO). Le NO possède des propriétés vasodilatatrices et antithrombotiques impliquées dans le contrôle de la pression artérielle et la régulation du tonus vasculaire en agissant sur les cellules adjacentes, tel les CMLV. De plus, ces cellules régulent la production et la composition de la MEC (Choy et al., 2004). La dysfonction de l'endothélium est impliquée dans le développement des maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose.

### **1.2.2.2 Cellules musculaires lisses vasculaires**

Les CMLV sont impliquées dans la régulation du débit sanguin et de la pression artérielle via la contraction et la relaxation cellulaire. Le niveau de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaire est impliqué dans l'état de contraction des CMLV. Ces cellules sont dans un stade final de différenciation et elles ont la capacité de répondre à divers agents dont l'angiotensine II (Ang II) et le NO. Par contre, sous des conditions pathologiques, elles modifient et/ou amplifient la réponse. Les substances vasoconstrictrices, tel l'Ang II, sont impliquées dans l'hypertension artérielle via la contraction des CMLV par l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique suite à l'activation de protéines G. Par contre, les substances vasodilatatrices, dont le NO, sont impliquées dans la relaxation du vaisseau. De plus, les CMLV stimulées par l'Ang II, sécrètent des composantes de la MEC dont le collagène (Lusis et al., 2004). Lors de conditions pathophysiologiques, tel l'athérosclérose,

ces cellules sont impliquées dans de nombreuses étapes du développement de cette pathologie.

### **1.2.2.3 Matrice extracellulaire**

La MEC est majoritairement composée d'élastine et de collagène afin d'assurer l'intégrité du vaisseau sanguin. Les fibres de collagène assurent la rigidité du vaisseau tandis que l'élastine assure sa flexibilité. La MEC est une composante importante de la plaque athérosclérotique et elle est particulièrement abondante dans les lésions avancées (Libby, 2002). La dégradation de la MEC est impliquée dans la rupture de la plaque athérosclérotique.

## **1.3 Athérosclérose**

L'athérosclérose est une lésion progressive de la paroi des artères moyennes et larges qui se caractérise par des processus inflammatoires chroniques conduisant à une accumulation importante de lipides dans l'espace subendothélial, menant au développement de la plaque d'athérosclérose. Une succession d'étapes sont distinguées dans l'évolution de cette pathologie (Figure 2, page 5).

Lors de la première étape, on assiste à la formation de la strie lipidique. Celle-ci, occasionnée par la dysfonction de l'endothélium, implique un changement de ses propriétés normales et conduit à une augmentation de l'entrée de lipides dans l'intima ainsi que l'adhésion des leucocytes circulants. Ensuite, la progression de la lésion, suite à la migration et à la prolifération des CMLV de la média vers l'intima, implique la seconde étape soit la formation de la plaque fibreuse. Finalement, les stades plus avancés de l'athérosclérose causés par l'accumulation de CMLV et de leucocytes conduisent à la formation d'un cap fibreux exposé vers la lumière du vaisseau. Selon la stabilité du cap fibreux, de nombreuses complications médicales, dont l'infarctus du myocarde, peuvent

résulter des suites de la rupture de ce cap. (Libby, 2002). Toutes les étapes impliquées dans le développement de l'athérosclérose sont décrites plus en détail dans les lignes suivantes.

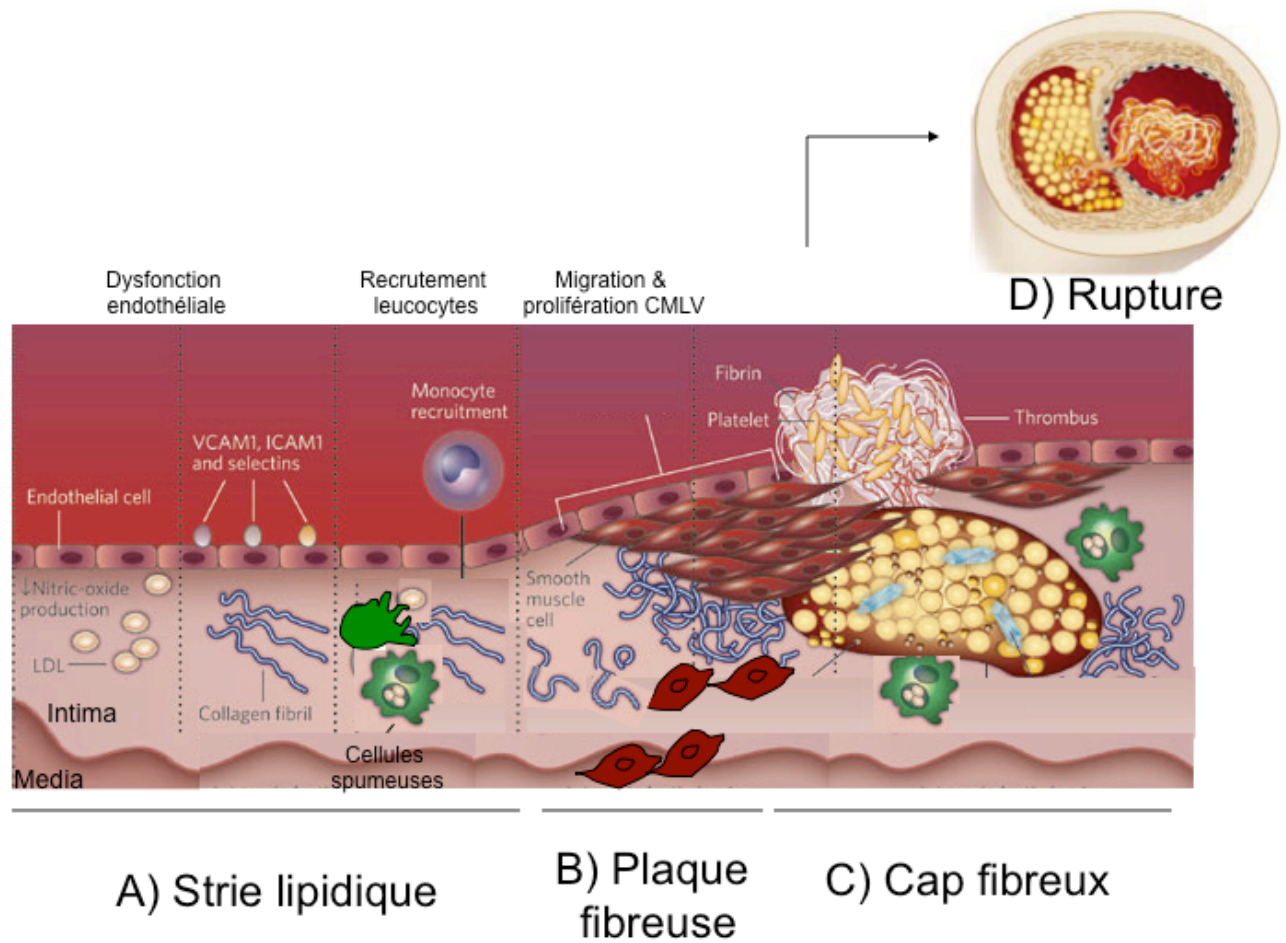


Figure 2 : **Développement de l'athérosclérose.** Figure modifiée de (Libby, 2002; Sanz and Fayad, 2008).

### 1.3.1 Étapes précoces - Formation de la strie lipidique

Suite à un stress ou à la combinaison de différents facteurs de risques liés au développement de l'athérosclérose, l'endothélium subit divers dommages et il acquiert de nouvelles propriétés. Ces changements critiques sont impliqués dans les premières étapes menant au développement de l'athérosclérose. La dysfonction de l'endothélium mène à une diminution de l'expression de NO par les cellules endothéliales causant une augmentation de la vasoconstriction. Ensuite, le rôle de barrière de l'endothélium est altéré, augmentant la perméabilité de l'endothélium aux macromolécules dont les lipoprotéines. Ces lipoprotéines peuvent s'accumuler au niveau de l'intima où elles peuvent subir de nombreuses modifications, dont l'oxydation. Finalement, le dommage de l'endothélium cause le changement de l'expression de molécules d'adhésion des leucocytes par les cellules endothéliales dont la P-sélectine, la E-sélectine, *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) et majoritairement *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), impliquées dans l'adhésion des monocytes et des lymphocytes T circulants à l'intima (Libby, 2002). L'implication de l'accumulation et la modification des lipides ainsi que du recrutement des leucocytes sont décrits dans les lignes suivantes.

#### 1.3.1.1 Rôles physiologiques et production des lipoprotéines

Les lipides assurent de nombreux rôles dans l'organisme dont la constitution des membranes cellulaires, l'apport énergétique et la synthèse d'hormones stéroïdiennes. Trois types de lipides sont majoritairement retrouvés, soit les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol. Ce sont des molécules hydrophobes qui, par le biais de protéine de transport, les lipoprotéines, sont acheminées dans la circulation sanguine (Tortora, 2001).

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de densité variables et sont normalement composées d'un corps lipidique hydrophobe composé de triglycérides et d'esters de cholestérol entouré d'une monocouche de phospholipides et de cholestérol amphiphiles, contenant des protéines polaires, les apolipoprotéines (apo). Ces apo sont



responsables du transport des lipides dans le sang ainsi que du rôle respectif de chaque lipoprotéine (Lusis et al., 2004). Les lipoprotéines sont classées selon leur densité, déterminée par le rapport entre leur composition en lipides ainsi qu'en protéines. Quatre classes principales de lipoprotéines sont retrouvées dans la circulation ; les chylomicrons, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Deux voies majeures permettent la formation de ces lipoprotéines. La première provient de l'absorption alimentaire (voie exogène) et la seconde de la synthèse *de novo* dans les tissus (voie endogène)(Choy et al., 2004).

Les chylomicrons sont formés dans l'intestin grêle et permettent le transport des lipides alimentaires vers le sang. Lors de leur circulation dans les capillaires du tissu adipeux, leur apo C-2 active la lipoprotéine lipase (LPL) endothéliale, une enzyme responsable du clivage des acides gras des triglycérides contenu dans le chylomicron. Ces acides gras libérés sont emmagasinés par les cellules adipeuses. Les débris du chylomicron sont retirés de la circulation par endocytose via la liaison de leur apoE au récepteur des hépatocytes (Tortora, 2001).

La voie endogène débute par la formation des VLDL par les hépatocytes. Ces lipoprotéines sont composées, entre autre, des apoB-100, apoE et apo C-2. La fonction première des VLDL est d'assurer le transport des triglycérides et du cholestérol hépatique vers la circulation sanguine. Dans la circulation, les VLDL peuvent interagir avec les HDL via la *cholesteryl ester transfer protein* permettant l'échange de lipides entre ces structures. Cette interaction mène à la perte de triglycérides par le VLDL via l'activation de la LPL endothéliale dans les tissus adipeux et les muscles par la protéine apo C-2. Les structures restantes du VLDL, peuvent être convertis par la LPL en LDL, absorbés par les adipocytes ou encore dirigés vers le foie afin d'y être éliminés. L'élimination des LDL formés est accomplie par endocytose suite à la reconnaissance de apoB-100 aux récepteurs du LDL des cellules hépatiques. Les LDL sont les transporteurs principaux du cholestérol sanguin vers le tissu et sont composés de cholestérol libre, de phospholipides, de triacylglycérol, d'ester de cholestérol et d'apoB-100. Lorsque la concentration de LDL est en excès, le

dépôt de cholestérol à l'intérieur des fibres musculaires lisses des artères est impliqué dans les stades précoces de l'athérosclérose (Rader and Daugherty, 2008). Contrairement aux LDL, les HDL préviennent l'accumulation de lipides dans les vaisseaux. En effet, ces lipoprotéines sont synthétisées par le foie et l'intestin puis relâchées dans le sang par exocytose. Les HDL emmagasinent le cholestérol des tissus périphériques via le transporteur ABC-A1 puis ils sont dirigés vers le foie où ils sont éliminés par sécrétion biliaire (Choy, 2004). Les lipoprotéines de transports les plus abondantes, les LDL et les HDL, majoritairement composées de cholestérol occupent des fonctions opposées dans l'organisme, ce qui explique leur rôle distinct dans le développement de l'athérosclérose (Tortora, 2001).

### **1.3.1.2 Accumulation et modification des lipides**

Une mauvaise régulation des voies impliquées dans le métabolisme des lipides peut engendrer plusieurs complications. De nombreuses évidences scientifiques démontrent l'implication du métabolisme des lipides dans le développement de l'athérosclérose. En effet, le développement de cette pathologie corrèle avec l'augmentation de lipides plasmatiques mais plus précisément un niveau élevé de LDL. Cette augmentation peut être causée par un excès de la production de lipoprotéines par le foie ainsi que par un défaut au niveau de la clairance du LDL plasmatique (Choy et al., 2004). De plus, des études dans des souris déficientes en apoE ou en récepteurs au LDL démontrent l'implication du métabolisme des lipides puisque ces souris développent des lésions athérosclérotiques (Lusis et al., 2004). À l'inverse, des études *in vivo* démontrent que les HDL ont un rôle protecteur dans le développement de l'athérosclérose via l'emmagasinement du cholestérol en excès et par l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines (Lusis et al., 2004; Rader and Daugherty, 2008). De plus, l'injection ou la surexpression de apoA-I, constituant majeur des HDL, diminue l'athérosclérose.

Une concentration élevée de LDL sanguin ainsi qu'une dysfonction endothéliale favorise le passage des lipides dans l'espace subendothélial. La migration des LDL au

niveau de l'intima mène à leur liaison aux protéoglycanes de la MEC. Ceux-ci restent trappés dans l'intima amplifiant leur temps de rétention et de ce fait même, leur susceptibilité aux modifications. Les lipides peuvent subir de nombreuses modifications dont l'oxydation suite au relâchement de radicaux libres par les cellules avoisinantes dont les cellules endothéliales, les CMLV et les macrophages. Le LDL subit une transformation en LDL oxydé (ox-LDL), une molécule reconnue par le système immunitaire comme un antigène et impliquée dans les étapes initiales de l'athérosclérose. En effet, l'ox-LDL acquiert de nouvelles propriétés en agissant de façon chimioattractante pour les monocytes circulants menant par la suite à l'accumulation de lipides modifiés. De plus, il augmente l'expression de molécules inflammatoires par l'endothélium (Choy et al., 2004).

### 1.3.1.3 Recrutement des leucocytes circulants

La dysfonction endothéliale implique, suite à l'entrée et à la modification des lipides, l'augmentation de l'adhésion des leucocytes circulants à l'intima. Comme mentionné précédemment, ce phénomène est causé par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion aux leucocytes par les cellules endothéliales tel VCAM-1. L'entrée des leucocytes dans l'espace subendothélial se fait par diapédèse au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales. Ce phénomène est favorisé par un gradient de molécules chimioattractives, dont l'ox-LDL et principalement par l'expression de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) pour les monocytes et les trois *chimiokines inducible* *interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ), *inducible protein 10* (IP-10), *monokine induced by IFN- $\gamma$*  (Mig) et *IFN-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant* (I-TAC) pour les lymphocytes T (Libby, 2002).

L'entrée des monocytes est, par la suite, favorisée par la liaison de son récepteur de surface CCR2 à MCP-1. Une fois au niveau de l'intima, les monocytes se différencient en macrophages entre autre via l'expression de *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Ce facteur est impliqué dans l'augmentation de l'expression du récepteur scavenger, *scavenger receptor A* (SRA), du récepteur CD36 et de l'augmentation de la production de cytokines et de facteurs de croissance. Les macrophages internalisent les lipoprotéines

modifiées (ox-LDL) via les récepteurs scavengers SRA et CD36 et accumulent des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme menant à la formation de cellules spumeuses (Choy et al., 2004). Récemment, l'hétérogénéité des monocytes impliqués dans l'athérosclérose a été démontrée. En effet, deux populations monocytaires, soit l'une moins inflammatoire décrite précédemment et une seconde plus inflammatoire sont présentes dans l'athérosclérose. Cette seconde population de monocytes exprime les récepteurs TLR et les cytokines inflammatoires *tumor necrosis factor* (TNF $\alpha$ ) et l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Libby et al., 2009).

Sous ces conditions pathologiques, l'entrée des lymphocytes T est également favorisée. Lors de l'entrée de ces cellules dans l'intima, le récepteur CXCR3 exprimé par ces cellules lie les chimiokines IP-10, Mig et I-TAC. Au niveau de l'intima, les lymphocytes T reconnaissent les ox-LDL comme des antigènes. En effet, près de 10% des lymphocytes T reconnaissent les ox-LDL spécifiquement par le CMH de classe II (Andersson et al., 2010). Il est suggéré que la présentation d'antigène dans les lésions athérosclérotiques se fait au niveau des cellules T déjà activées plutôt que par l'activation de cellules T naïves. Le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup> dans le développement des lésions athérosclérotiques est maintenant reconnu cependant celui des cellules T CD8<sup>+</sup> reste encore à être confirmé (Andersson et al., 2010). La reconnaissance du ox-LDL par les lymphocytes T mène à la production de cytokines par les lymphocytes T et influence les cellules adjacentes. La communication entre les lymphocytes et les macrophages implique une amplification de l'inflammation locale. En effet, les lymphocytes expriment le récepteur CD154 qui reconnaît le récepteur CD40 des macrophages et mène à l'expression des métalloprotéinases (MMPs) et des cytokines proinflammatoires (Libby, 2002).

L'accumulation de cellules spumeuses causée par la phagocytose de l'ox-LDL par les macrophages ainsi que par l'activation de voies de signalisations inflammatoires sont les étapes préliminaires menant à la formation de la strie lipidique. L'entrée des monocytes au niveau de l'intima est une étape critique dans le développement de l'athérosclérose. En effet, des études réalisées dans des souris déficientes en MCP-1 et CCR2 ont démontré une

moindre production de lésions athérosclérotiques (Lusis et al., 2004). L'entrée des monocytes a aussi lieu dans les stades plus avancés de la maladie (Libby et al., 2009). Les cellules spumeuses et les lymphocytes T participent ainsi de façons actives aux complications de l'athérosclérose par l'expression de cytokines amplifiant l'inflammation et la dégradation de la MEC (Libby, 2002).

### **1.3.2 Étapes intermédiaires – Formation de la plaque fibreuse**

La progression de l'athérosclérose vers des stades plus préoccupants mène à la formation de la plaque fibreuse. Cette plaque est formée suite à la migration des CMLV de la média vers l'intima ainsi que par la prolifération de ces cellules au niveau de l'espace subendothélial. Cette étape est initiée par la sécrétion de facteurs de croissance, de MMPs et de cytokines par les macrophages et les cellules T suite à la liaison de leurs récepteurs CD40 et CD154. L'activation des CMLV mène à la sécrétion abondante des composantes de la MEC dont le collagène augmentant par le fait même le temps de rétention et l'agrégation des ox-LDL (Ross, 1999). À ce stade, les CMLV diminuent leurs propriétés contractiles au profit de leurs propriétés synthétiques.

### **1.3.3 Étapes critiques – Formation du cap fibreux et rupture de la plaque**

La formation du cap fibreux implique de nombreux effets biologiques dans l'intima dont l'accumulation de CMLV, de la MEC, de cellules spumeuses ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires. Cette étape implique la formation d'un corps nécrotique composé d'un amas de leucocytes, de lipides et de débris cellulaires suite à l'apoptose et à la nécrose des cellules environnantes causés suite à l'accumulation de lipides et par l'augmentation de l'activité protéolytique des MMPs (Ross, 1999). La formation du cap fibreux entourant le corps nécrotique dépend de l'activité synthétique des CMLV. Cette étape prévient la formation de thrombus (Newby and Zaltsman, 1999). Ce stade est le plus avancé dans la formation de la plaque athérosclérotique et à long terme peut mener à des complications cliniques.

Les plaques athérosclérotiques stables, soit les plaques riches en MEC et contenant peu de lipides, peuvent rester fixes et ne pas causer de problèmes majeurs. Par contre, certaines plaques sont vulnérables et leur rupture peut causer des troubles majeurs par la formation d'une protubérance exposée à la lumière du vaisseau, le thrombose. Ces plaques sont composées d'une concentration élevée de lipides, de macrophages et d'un mince cap fibreux.

La rupture de la plaque implique deux mécanismes majeurs, soit la dégradation de la MEC et la diminution de l'activité des CMLV. Tout d'abord, l'activité des MMPs, exprimées par les CMLV, dont les collagénases, les élastases ainsi que d'autres enzymes protéolytiques, mène à un amincissement de la paroi du cap fibreux. Ensuite, l'expression de cytokines proinflammatoires dont le  $TNF\alpha$  et l' $IFN-\gamma$  inhibe la synthèse de collagène par les CMLV. L'apoptose des cellules dans la plaque athérosclérotique dont les CMLV dû à l'expression de l' $IL-1\beta$  et du  $TNF\alpha$  par les cellules adjacentes contribue à la rupture de la plaque puisque cet événement est associé à une augmentation de l'inflammation par le recrutement de leucocytes. De plus, l'augmentation des forces de cisaillement a un impact sur la stabilité de la plaque (Libby, 2002).

La rupture de la plaque athérosclérotique dans la circulation coronarienne provoque le contact entre le sang et la matrice sous endothéliale ce qui active le système plaquettaire. L'activation et la sécrétion des plaquettes est débutée par la liaison de leur récepteur GPIa/IIa au collagène ainsi que de GP1b au facteur Van Willbrand. Cette étape est suivie de la liaison de GPIIb/IIIa au fibrinogène menant à l'agrégation plaquettaire. L'activation de la coagulation par le clivage de la prothrombine en thrombine mène à la formation de fibrine à partir du fibrinogène. Les plaquettes activées relâchent du *platelet-derived growth factor* (PDGF) et du *transforming growth factor bêta* ( $TGF-\beta$ ) impliquant une stimulation de la migration des CMLV et la stimulation de la production de collagène (Libby, 2002). De plus, ces cellules expriment la thromboxane A2 (TXA2) et de la sérotonine, des vasoconstricteurs. La formation de ce thrombose peut mener à diverses complications cliniques. En effet, le blocage d'une artère coronaire du cœur peut mener à des angines et la

progression de l'athérosclérose dans les artères coronaires peut causer une crise cardiaque. Un blocage au niveau des vaisseaux du cerveau peut mener à un accident vasculaire cérébral (AVC). L'obstruction d'un vaisseau sanguin important peut même entraîner la mort subite. Près des trois quart des infarctus du myocarde sont causés par la rupture de la plaque athérosclérotique. Il est alors primordial de connaître les facteurs de risques associés au développement de cette pathologie afin de prévenir les complications cliniques qui y sont reliées.

### **1.3.4 Facteurs de risque**

Depuis les 50 dernières années, de nombreuses études épidémiologiques ont identifié les facteurs de risques menant au développement de l'athérosclérose. Cette pathologie est causée par une multitude de facteurs mais deux groupes principaux sont distingués ; les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Les principaux facteurs génétiques sont l'hypercholestérolémie, le diabète de type 2, l'âge, le sexe, le taux d'homocystéine et l'hypertension. Les facteurs environnementaux sont l'exercice, la diète, la pollution, les infections et la cigarette (Lusis et al., 2004). Certains de ces facteurs sont décrits dans les lignes suivantes.

#### **1.3.4.1 Facteurs génétiques**

Les facteurs génétiques regroupent les maladies reconnues dans le développement de l'athérosclérose. Comme mentionné précédemment, la concentration élevée de LDL plasmatique est impliquée dans les premières étapes du développement de la maladie. En effet, un taux élevé de LDL favorise son accumulation dans l'espace subendothélial. Par contre, le HDL joue un rôle protecteur puisqu'il empêche l'accumulation de cholestérol dans le tissu en le rapatriant dans la circulation. De nombreuses mutations génétiques rares peuvent engendrer une augmentation de la concentration de LDL ou encore une diminution de la concentration de HDL. Ainsi, l'hypercholestérolémie entraîne une augmentation du taux LDL/HDL. Des études

démontrent que les gens atteints d'hypercholestérolémie présentent une dysfonction endothéliale et une augmentation de la prolifération des CMLV (Lusis et al., 2004). La concentration de lipoprotéine est alors primordiale dans les premières étapes de l'athérosclérose.

L'homocystéine est un acide aminé intermédiaire dans la réaction enzymatique menant à la formation de la cystéine à partir de la méthionine. L'augmentation de la concentration plasmatique de l'homocystéine est un facteur de risque menant au développement de l'athérosclérose. Cet acide aminé est toxique pour l'endothélium et est prothrombotique. L'homocystéine augmente la production de collagène par les CMLV et diminue la disponibilité du NO (Ross, 1999). Pour la moitié des patients ayant un niveau élevé d'homocystéine l'on retrouve un polymorphisme du gène de la méthylène tetrahydrofolate réductase, enzyme responsable de la conversion de l'homocystéine en méthionine (Choy et al., 2004; Lusis et al., 2004).

L'hypertension artérielle se caractérise par une forte pression du sang au niveau du système circulatoire. Au Canada, environ une personne sur cinq est atteinte d'hypertension artérielle (Fondation des maladies du coeur, 2010). Près de 90% des cas d'hypertension sont dits primaires ou essentielles car aucune cause n'est précisément identifiée chez ces patients cependant des facteurs génétiques semblent impliqués (Santé Canada, 2006). L'augmentation de la concentration de l'hormone active du système rénine angiotensine (RAS), l'Ang II, est un facteur de risque classique de l'athérosclérose. En effet, des études démontrent une augmentation de l'activité du RAS chez les patients atteints de cette pathologie. L'Ang II a des propriétés vasoconstrictrices et stimule directement la croissance des CMLV et la production de la MEC (Lusis et al., 2004). De plus, ce composé exerce des effets proinflammatoires par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion des leucocytes, VCAM-1 ainsi que de l'expression de MCP-1, par les cellules endothéliales et de l'IL-6 par les CMLV (Libby, 2002). Cette hormone est ainsi impliquée au niveau des étapes précoces et tardives du développement de l'athérosclérose et sera discuté plus en détail dans l'une des sections suivantes.



#### 1.3.4.2 Facteurs environnementaux

Depuis quelques années, un facteur émergent impliqué dans le développement de l'athérosclérose est l'infection par des agents pathogènes. En effet, lors de la pratique d'autopsie, les microorganismes *herpes virus* et *Chlamydia pneumoniae* ont été retrouvés au niveau des lésions athéromateuse dans les artères coronaires (Ross, 1999) Par contre, les mécanismes d'actions de ces agents pathogènes sont encore inconnus. De plus, des études suggèrent que les infections chroniques augmentent la sécrétion de cytokines proinflammatoires ce qui influence le développement de l'athérosclérose.

L'obésité grandissante dans notre population est inquiétante puisqu'elle est la cause de nombreuses pathologies. Cette maladie est associée à un tour de taille et un indice de masse corporelle élevé. Les gens atteints d'obésité peuvent développer le diabète suite à la résistance à l'insuline ou encore la dyslipidémie, menant à l'augmentation du rapport LDL/HDL. D'autre part, un régime alimentaire riche en lipides favorise la production de VLDL augmentant de ce fait même le taux de LDL et la formation de la plaque athérosclérotique (Tortora, 2001). De plus, les cellules adipeuses expriment des cytokines inflammatoires tels l'IL-6 et le TNF $\alpha$ .

Le tabagisme est un facteur important dans cette pathologie puisqu'il augmente le stress oxydatif. En effet, la fumée provenant des cigarettes produit des radicaux libres impliqués dans la production des ox-LDL et la formation de molécules proathérogéniques (Ross, 1999).

Les études démontrent que l'athérosclérose est causée par la combinaison d'une variété de facteurs de risques. Entre autre, il n'est pas rare de rencontrer un patient fumeur pratiquant peu d'activité physique atteint d'hypertension et d'hypercholestérolémie. Ainsi, il est primordial d'identifier les gènes et les voies moléculaires impliquées dans l'athérosclérose afin d'obtenir de nouveaux traitements personnalisés prévenant le développement de cette maladie par le biais de nouveaux composés pharmacologiques. Les traitements présentement disponibles sont discutés dans les lignes suivantes.

### 1.3.5 Traitements disponibles

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle impliquant des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Bien sûr, certains facteurs ne peuvent être remédiés tels l'âge et le sexe. Par contre, la meilleure prévention au développement de cette pathologie est le contrôle des facteurs environnementaux. En effet, le changement du mode de vie est l'étape capitale de la prévention de la progression de l'athérosclérose, en limitant les facteurs impliqués dans cette maladie dont les facteurs de stress, la consommation d'alcool, le tabagisme et l'obésité. Les décisions de cesser de fumer, de pratiquer régulièrement de l'exercice physique ainsi que de s'engager à adopter une saine alimentation pauvre en lipides saturés et en gras trans peuvent prévenir le développement et la progression de cette pathologie. Chez certains patients, ces changements majeurs ne sont pas assez efficaces à prévenir le développement de cette maladie dû aux facteurs génétiques impliqués. Ainsi, le changement des habitudes de vie accompagné de la prise de composés pharmacologiques spécifiques est le meilleur traitement disponible pour ces patients. En effet, la connaissance des causes menant au développement de l'athérosclérose a permis la mise en marché d'un arsenal de composés pharmacologiques (Lusis et al., 2004). Le contrôle du maintien de la tension artérielle, du diabète et du taux de cholestérol sont les trois critères sur lesquels les médecins se penchent afin de réduire les risques de la progression de l'athérosclérose.

La prescription de statines est importante chez les patients atteints d'hypercholestérolémie. Les statines sont des inhibiteurs de l'enzyme impliquée dans l'étape critique de la biosynthèse du cholestérol, la HMG-CoA reductase. Cela permet de contrôler le niveau de lipides plasmatique par la diminution de cholestérol et l'augmentation de la clairance de LDL plasmatique par le foie (Rader and Daugherty, 2008). Ces composés ont aussi un rôle anti-inflammatoire via l'inhibition de la production d'intermédiaires enzymatiques dont le geranylgeranyl-pyrophosphate, impliqués dans la modification des petites protéines G (Libby, 2002). Les dérivés de l'acide fibrique sont aussi utilisés afin de contrôler le cholestérol et l'inflammation chez les patients atteints d'hypercholestérolémie. Ces composés activent le facteur de transcription *peroxisome*

*proliferator activated-receptor* (PPAR- $\alpha$ ) ayant, par le fait même, un rôle protecteur et anti-inflammatoire par la diminution de triglycérides et une augmentation de apoA-I, une apoprotéine du HDL. De plus, ces composés pharmacologiques permettent la diminution de l'expression de VCAM-1 par la compétition entre les facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B et PPAR- $\alpha$  pour leurs coactivateurs (Libby, 2002).

Le RAS est impliqué dans le contrôle de la pression artérielle et du tonus vasculaire. Ainsi, une dérégulation de ce système peut mener à une augmentation de la pression artérielle. Afin de traiter les patients atteints d'hypertension, plusieurs inhibiteurs des composantes de ce système sont prescrits, entre autre, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (ACE) et les bloqueurs du récepteur à l'Ang II (ARB) (Rader and Daugherty, 2008). L'utilisation de ces inhibiteurs est préférée à l'utilisation des  $\beta$ -bloqueurs puisque les effets observés des inhibiteurs du RAS sur la progression de l'athérosclérose sont plus importants que seulement le contrôle de la pression sanguine. En effet, l'inhibiteur de l'ACE empêche la production de l'Ang II, l'hormone active du RAS, diminuant de ce fait même les effets proinflammatoires du peptide. Les inhibiteurs du ARB agissent directement au niveau du récepteur à l'Ang II 1 (AT1R) par le blocage du site actif du ligand et offre des effets similaires aux ACE.

L'aspirine est un inhibiteur de la cyclooxygénase 1 (COX1) et diminue la formation de TXA2, un lipide proathérogénique (Rader and Daugherty, 2008). De plus, l'aspirine est reconnue pour ses effets antiplaquettaires et est alors prescrit chez les gens ayant déjà eu des AVC et présentant divers facteurs de risques afin de réduire les risques de la formation d'un caillot (Chapman, 2007).

De nombreux composés pharmacologiques sont présentement sur le marché et permettent un ralentissement de la progression de l'athérosclérose par contre, cette pathologie est hétérogène. En effet, le stade d'évolution de la maladie chez les patients est à des niveaux distincts et ainsi, une augmentation de l'arsenal des composés pharmacologiques permettra de traiter chaque patient de façon individuelle dans l'avenir.

Présentement, les prochaines cibles thérapeutiques ciblées dans les recherches sont les lipides inflammatoires ainsi que les molécules d'adhésion (Libby et al., 2009).

## **1.4 Le système rénine angiotensine**

Le RAS est connu depuis plus de 100 ans, suite aux investigations entreprises par l'équipe du physiologiste Robert Tigerstedt. Depuis quelques décennies, les recherches sont axées sur son implication dans les maladies cardiovasculaires. Dans l'organisme, deux systèmes RAS sont retrouvés, soit le système circulatoire et le système local. Le RAS est une cascade enzymatique menant à la formation de l'effecteur principal du système, l'Ang II. (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008). Les deux systèmes RAS sont décrits dans les lignes suivantes.

### **1.4.1 Système circulatoire**

Le système circulatoire est le premier à avoir été découvert et son implication dans l'équilibre hydro-électrolytique et la pression sanguine est reconnue (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008). La cascade enzymatique du RAS classique est initiée suite au clivage de l'angiotensinogène (AGT), constitutivement relâché par le foie vers la circulation, par une amidopeptidase sécrétée par le rein, la rénine. Cette réaction produit un décapeptide, l'Ang I qui, par l'action de l'ACE, une protéase présente sur les cellules endothéliales pulmonaires et vasculaires, est clivé en Ang II. L'Ang II exerce ses actions via la liaison à deux récepteurs, le récepteur AT1 (AT1R) et le récepteur AT2 (AT2R). Les caractéristiques de ceux-ci sont discutées dans la section suivante.

### **1.4.2 Système tissulaire**

Le système tissulaire, aussi nommé système local, est impliqué dans la prolifération, la croissance et la synthèse protéique. Dans certains organes, ce système agit indépendamment du système circulatoire tandis que pour d'autres, tel le cœur, il agit en

proximité (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008). Dans le système local, la production d'Ang II est formée au niveau de la cellule mais aussi dans l'espace interstitiel ainsi on distingue, le système local extracellulaire et intracellulaire. Récemment, l'augmentation du système local intracellulaire est associée à des pathologies cardiaques dû à son implication au niveau de la prolifération et de la croissance cellulaire. Le système local est spécifique au tissu et il utilise certaines enzymes distinctes du système circulatoire. En effet, certains types cellulaires dont les CMLV possèdent des enzymes distinctes du RAS classique permettant le clivage de l'AGT en Ang II, la cathepsin D, et le clivage de l'Ang I en Ang II, la chymase. Les cellules du tissu expriment des récepteurs de la prorénine permettant la liaison de la prorénine et la synthèse locale d'Ang II. La formation d'Ang II extracellulaire est dépendante de l'ACE et de la rénine tandis que la synthèse intracellulaire d'Ang II est plus diversifiée car elle implique la cathepsin D, la rénine, la chymase et l'ACE. Dans un tissu sain, la chymase est normalement emmagasinée dans des vésicules sécrétoires. Suite à un dommage vasculaire, les vésicules sont relarguées menant à la relâche de la chymase et ainsi à une augmentation de la production d'Ang II (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008). De plus, une concentration élevée d'Ang II et d'ACE sont retrouvées dans les lésions athérosclérotiques (Kumar and Boim, 2009). Dans le système tissulaire, l'Ang I et l'Ang II peuvent aussi subir un clivage par l'action de la carboxypeptidase ACE2 qui diminue le niveau d'Ang II et augmente la production du fragment Ang 1-9 ou du fragment Ang 1-7 ayant des propriétés vasodilatatrices (Mehta and Griendling, 2007). De nombreuses recherches démontrent que l'Ang II peut être clivé, par l'action de l'aminopeptidase A en Ang III (fragment 2-8) qui peut subir, à son tour, un clivage par l'aminopeptidase M en Ang IV (fragment 3-8). Ces deux peptides ont des actions biologiques mais elles sont encore peu comprises à ce jour. L'Ang III exerce ses effets, soit la vasoconstriction et la relâche d'aldostérone, par la liaison aux mêmes récepteurs que l'Ang II, soit le AT1R et le AT2R (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008; Hunyady and Catt, 2006). Récemment, une équipe a découvert un récepteur à l'Ang IV, le *insulin-regulated amino peptidase receptor* (IRAP). La liaison du ligand au récepteur enclenche une diversité d'effets biologiques dont l'activation de NF- $\kappa$ B et l'hypertrophie cellulaire. Ainsi, des études sur l'implication de ce

peptide dans la réponse inflammatoire vasculaire devront être effectuées dans le futur afin d'investiguer son rôle dans le développement des pathologies cardiovasculaires. L'Ang 1-7 lie le récepteur mas oncogène (Mas) et initie des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs. Ce peptide a alors des effets opposés à l'Ang II et permettrait de créer un équilibre dans le RAS (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008). Les composants circulatoires du RAS, l'Ang I, l'Ang II, AGT et la rénine contribuent au niveau de la concentration d'Ang II dans le système tissu spécifique (Kumar and Boim, 2009).

### **1.4.3 Rôles physiologiques du système rénine angiotensine**

Les rôles physiologiques du RAS résultent des actions de l'effecteur principal du système, l'Ang II. Le rôle premier de cet octapeptide est impliqué dans le rétablissement de la pression artérielle. Les effets de l'Ang II sont initiés suite à sa liaison à des récepteurs transmembranaires spécifiques, AT1R et AT2R (section suivante). Cet événement occasionne de nombreux effets physiologiques. En effet, l'Ang II régule une variété de réponses biologiques dû à ses actions au niveau du système nerveux central où il agit tel un neurotransmetteur et influence la pression sanguine, la réabsorption sodique du rein, la sensation de soif ainsi que la synthèse et la relâche d'aldostérone. Le AT1R est exprimé dans plusieurs régions du cerveau qui sont impliquées dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et l'homéostasie. Le AT1R est abondamment exprimé au niveau de l'hypothalamus et des organes circumventriculaires. L'area postrema et l'organe subfornical (SFO) sont impliquées dans la régulation de la pression. De plus, la région du SFO est aussi impliquée dans la sécrétion de la vasopressine, la relâche d'*adrenocorticotropin* (ACTH), la réabsorption sodique et la sensation de soif. Au niveau du SFO, lors de la liaison de l'Ang II au AT1R, un signal est transmis vers l'hypothalamus, plus précisément au niveau du noyau paraventriculaire et influence la relâche de vasopressine et d'ACTH. Ensuite, la sensation de soif est perçue suite à la transmission du signal du SFO vers le noyau optique médial. En plus, l'Ang II influence la fonction rénale par la vasoconstriction de l'artériole efférente du glomérule ce qui altère la dynamique des

capillaires péritubulaires et influence le débit sanguin rénal. Par la suite, l'augmentation d'aldostérone stimule la réabsorption sodique par les récepteurs des minéralocorticoïdes des tubules collecteurs et l'Ang II augmente la concentration de l'urine (de Gasparo et al., 2000; Kobori et al., 2007). De plus, dans le système cardiovasculaire, le RAS est impliqué au niveau du remodelage vasculaire, de la contraction des CMLV, du maintien du tonus vasculaire, de l'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type L, de la migration et de la croissance cellulaire. (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008; Mehta and Griendling, 2007).

## **1.5. Les récepteurs de l'angiotensine II**

L'Ang II exerce ses effets biologiques via la liaison à des récepteurs transmembranaires à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). Deux récepteurs de l'Ang II sont connus, le AT1R et le AT2R. La majorité des effets biologiques et pathophysiologiques de l'Ang II sont via l'activation du AT1R, mais au cours des dernières années de nombreux avancés ont été réalisés au niveau de la compréhension des voies moléculaires du AT2R. Les caractéristiques de ces récepteurs sont décrites dans les lignes suivantes.

### **1.5.1 Morphologie des récepteurs de l'Ang II**

Le AT1R humain contient 359 acides aminés (40kDa). Le domaine extracellulaire du récepteur contient une partie N-terminal et trois boucles extracellulaires. Cette partie contient trois sites consensus pour la N-glycosylation ainsi que quatre résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures essentiels à la liaison de l'Ang II au récepteur. La portion cytoplasmique contient trois boucles intracellulaires ainsi que la partie C-terminal. Cette partie C-terminal du AT1R contient plusieurs résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylés par les kinases GPCR (GRKs) afin d'initier le processus de désensibilisation et d'internalisation du récepteur (Mehta and Griendling, 2007). La protéine G interagit entre la première et la troisième boucle intracellulaire. Le AT1R peut former des homo ou hétéro oligomères avec d'autres récepteurs dont le récepteur de la

bradykinine B2, les récepteurs  $\beta$ 2adrénergique et le récepteur de la dopamine D2. Plusieurs études démontrent un facteur génétique important de ce récepteur dans les maladies cardiovasculaires. En effet, des polymorphisme d'un nucléotide (SNPs) du gène AT1R, le A1166C, est associé à une augmentation de la sensibilité à l'Ang II menant à des complications comme l'hypertension et les infarctus du myocarde (Mehta and Griendling, 2007). Chez le rat, deux isoformes du récepteurs sont identifiés, AT1AR, et AT1BR et partagent une homologie de séquence de 95%.

Le AT2R est composé de 363 acides aminés (41kDa) et partage une homologie de séquence de 34% avec le AT1R. Le AT2R est reconnu en tant qu'antagoniste physiologique du AT1R. En effet, la liaison de l'Ang II au AT2R induit des effets antiprolifératifs et pro-apoptotique au sein de l'organisme. Le AT2R peut former un hétérodimère avec le AT1R et altérer sa signalisation cellulaire.

### **1.5.2 Distribution tissulaire et régulation de l'expression des sous-types de récepteurs**

Chez l'humain, la distribution des récepteurs varie selon le tissu. Le AT1R est exprimé dans une variété de tissus à cause de son rôle primordial dans le contrôle de la pression artérielle. Cependant, ce sous-type est majoritairement exprimé dans les cellules du système cardiovasculaires dont les CMLV (Higuchi et al., 2007). La conservation du AT1R au cours de l'évolution démontre son importance au niveau physiologique. La régulation de l'expression du AT1R dépend d'une variété de facteurs de croissance, de cytokines et de son ligand l'Ang II. Certaines pathologies peuvent influencer l'expression du AT1R. Dans le système cardiovasculaire, le LDL et l'insuline augmentent l'expression du récepteur tandis que l'Ang II, l'EGF, le PDGF et le NO diminuent son expression (Mehta and Griendling, 2007). Chez le rat, les récepteurs AT1AR et AT1BR partagent des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles non distinguables. Cependant, leur distribution tissulaire permet de les distinguer. Des études *in vivo* démontrent l'implication de l'AT1AR dans le maintien de la pression sanguine (Mehta and Griendling, 2007).



Le AT2R est exprimé au niveau des tissus embryonnaires et peu de temps après la naissance, son expression est diminuée. Par contre, suite à des conditions pathologiques tel le remodelage vasculaire, son expression peut être induite chez l'homme (Mehta and Griendling, 2007).

### **1.5.3 Désensibilisation et internalisation du récepteur AT1**

Puisque les GPCR sont impliqués dans une diversité de processus biologiques, la cellule possède des mécanismes afin de réguler l'activation de ces récepteurs. Pour ce qui est du AT1R, la liaison de l'Ang II induit un changement de conformation du récepteur, impliquant la liaison de protéines G impliquées dans l'activation instantanée de plusieurs voies de signalisation et d'effecteurs protéiques. Suite à sa stimulation, le AT1R subit une désensibilisation ainsi qu'une internalisation rapide afin de réguler ce signal intracellulaire. Au départ, la désensibilisation du récepteur est initiée par la phosphorylation en résidus sérines et thréonines spécifiques de la queue C-terminale du domaine cytoplasmique du AT1R par des protéines kinases, les GRKs. Cela provoque un découplage de la protéine G et crée un site de haute affinité menant au recrutement des  $\beta$ -arrestines. Cette liaison de la  $\beta$ -arrestine au AT1R prévient le recouplage des protéines G. La  $\beta$ -arrestine contient des domaines de liaison à la clathrine et à la protéine adaptatrice 2 (AP-2) menant à l'endocytose du AT1R dans des vésicules tapissées de clathrines (Hunyady and Catt, 2006). De nombreuses études suggèrent que l'internalisation par les  $\beta$ -arrestines est aussi impliquée dans l'activation de voies de signalisations dont les MAPKs puisque les  $\beta$ -arrestines sont des protéines d'échafaudages.

Suite au processus d'internalisation, le AT1R associé à son ligand est retrouvé dans les endosomes. Le changement de pH induit un changement de conformation du récepteur ainsi que sa déphosphorylation par des phosphatases. Ces événements sont impliqués dans le recyclage du récepteur à la membrane plasmique. Le AT1R est désensibilisé par endocytose près de 10 minutes après son activation puis le quart de ces récepteurs sont

recyclés à la membrane et les autres ainsi que l'Ang II sont dégradés par lysosomes. (Mehta and Griendling, 2007).

#### 1.5.4 Signalisation du récepteur AT1

Les effets de l'Ang II sont initiés par l'activation d'une variété de cascades de signalisation (Figure 3, page 28). Les voies de signalisation majeures de l'Ang II suite à la liaison au AT1R sont dépendante ou indépendante de la protéine G. Ces protéines sont formées d'une sous-unité  $\alpha$ , une sous-unité  $\beta$  et une sous-unité  $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  dicte la spécificité du signal. Le AT1R peut s'associer aux sous-unités  $\alpha_{12/13}$  et  $\alpha_i$  mais il s'associe majoritairement à  $\alpha_q$ . L'activité de la protéine G hétérotrimérique est régulée par la liaison de molécule guanosine phosphorylée à la sous-unité  $\alpha$ .

Les actions immédiates de l'activation de l'AT1R par son ligand sont impliquées dans la contraction musculaire. La liaison de l'Ang II à son récepteur provoque son changement de conformation et permet l'activation de la protéine G hétérotrimérique suite à l'échange du guanosine diphosphate (GDP) par le guanosine triphosphate (GTP). Dans les CMLV, la liaison de l'Ang II à AT1R active la protéine  $G\alpha_q$ . Cette étape active la phospholipase C (PLC- $\beta$ ) menant à la production des seconds messagers; l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) et le diacylglycérol (DAG) suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate ( $PIP_2$ ) membranaire. Ces seconds messagers amplifient la cascade de signalisation.

La liaison de l' $IP_3$  à son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique provoque l'ouverture de canaux calciques permettant l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. La liaison du  $Ca^{2+}$  à la calmoduline induit l'activation de la *myosin light chain kinase* (MLCK). La MLCK phosphoryle la *myosin light chain* (MLC) et initie la contraction cellulaire. Cette contraction est maintenue jusqu'à la déphosphorylation de la MLC par la *myosin light chain phosphatase* (MLCP).

Le DAG active la protéine sérine thréonine kinase de type C (PKC). Cette kinase initie l'activation de la petite protéine Ras activant, de ce fait même, une cascade de signalisation impliquant les protéines Raf, MEK et ERK. L'activation de la PKC est maintenue par une augmentation de la concentration de DAG suite à la conversion de l'acide phosphatidique (PA) en DAG. Cette cascade est initiée par l'activation de la phospholipase D (PLD) par l'Ang II. La PLD permet l'hydrolyse du phosphatidylcholine (PC) en choline et en PA (Mehta and Griendling, 2007).

L'Ang II mène à la production d'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides membranaires suite à la phosphorylation et à l'activation de la phospholipase A2 (PLA2). L'AA est impliqué dans le tonus vasculaire, la formation de la pompe NADPH oxydase dans les CMLV et le métabolisme des prostaglandines, des lipides actifs (Mehta and Griendling, 2007). En effet, les prostaglandines PGI2 sont impliquées dans la vasodilatation tandis que les TXA2 sont impliqués dans la vasoconstriction des CMLV.

L'activation de PKC et l'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire contrôlent la suite des événements précoces de l'Ang II entre autre via l'activation de Src, FAK et Pyk2 (Hunyady and Catt, 2006). La phosphorylation en tyrosine du facteur de transcription cytoplasmique *signal transducers and activators of transcription* (STAT) suite à l'activation de la tyrosine kinase JAK par Pyk2 initie son activation et sa dimérisation. Cet événement implique sa translocation au noyau et permet la transcription de gènes dont c-fos et c-myc (Mehta and Griendling, 2007).

De plus, l'Ang II initie une seconde vague de réponse cellulaire suite à la transactivation de récepteurs tyrosine kinase transmembranaires, tel l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), le *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) l'*Insulin-like Growth Factor Receptor* (IGFR). Celle-ci est, entre autre, impliquée dans l'activation des voies MAPKs, une famille de sérine/thréonine kinases induisant un signal intracellulaire vers le noyau. Cette famille contient quatre membres principaux, ERK, JNK, p38 et *big*

MAPK-1. Dans les tissus de rats hypertendus, de nombreuses études démontrent que l'Ang II induit l'activation de trois de ces quatre MAPKs, soit ERK, JNK et p38 dans les cellules vasculaires (Min et al., 2009; Touyz, 2005). La voie ERK, est impliquée dans la croissance cellulaire tandis que les voies JNK et p38 sont impliquées dans l'inflammation, l'apoptose, la différenciation et la survie cellulaire. L'activation des MAPKs nécessite diverses protéines effectrices. La voie moléculaire la mieux caractérisée est la voie ERK.

L'activation de l'EGFR par l'Ang II est initié par l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  et l'activation de PKC et de Src. Src active les MMPs ce qui permet la relâche du ligand de l'EGFR, l'EGF lié à l'héparine (HB-EGF). La liaison de ce ligand à l'EGFR induit un changement de conformation du récepteur permettant sa dimérisation puis sa transphosphorylation en résidu tyrosine au niveau de sa queue cytoplasmique. Ces sites servent d'ancrage à diverses protéines effectrices contenant des domaines SH2 et mène au recrutement du complexe protéique Shc, Grb2 et Sos. L'activation de la petite protéine G Ras par ce complexe protéique mène à l'activation de deux voies de signalisation majeures, la voie PI3K-PDK1-Akt puis la voie Raf-1-MEK-ERK1/2 (Mehta and Griendling, 2007). Cependant, l'activation de ERK dans les CMLV utilisées dans le laboratoire ne passe pas par la transactivation de l'EGFR mais plutôt par Ras.

La voie Akt est impliquée dans la croissance, la survie et le remodelage cellulaire. L'étape critique dans l'activation de Akt est sa translocation du cytoplasme à la membrane cellulaire. Cette protéine contient un domaine pH qui lui permet de lier le  $PIP_3$  membranaire. La transactivation des récepteurs tyrosine kinase, mène à l'activation de la protéine PI3K ce qui permet la production de  $PIP_3$  à partir de  $PIP_2$ . Suite au recrutement de Akt à la membrane, l'enzyme PDK-1 phosphoryle Akt en Thr<sub>308</sub>. Akt est aussi phosphorylé en Ser<sub>473</sub> suite à l'activation de la voie *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Les mécanismes menant au recrutement d'Akt à la membrane cellulaire dans les voies de l'Ang II ne sont pas connus. Récemment, des études sur l'activation des récepteurs de facteurs de croissances *in vitro*, suggèrent l'implication de l'activité E3 ligase de la protéine TRAF6 dans la polyubiquitination en K63 de Akt permettant son recrutement aux  $PIP_3$

membranaires. L'activité E3 ligase de TRAF6 serait importante pour la phosphorylation de Akt en Thr<sub>308</sub> (Yang et al., 2009). Le rôle de TRAF6 dans l'activation de NF- $\kappa$ B selon divers ligands dont l'Ang II est discuté à la section 1.8.2.2.2 (page 49) et les caractéristiques des TRAF sont décrites à la section 1.8.3 (page 52).

L'Ang II est impliqué au niveau du stress oxydatif cellulaire via l'activation de la pompe NADPH oxydase. Son activation produit des anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) suite à la réduction d'une molécule d'oxygène. L' $O_2^{\cdot-}$  est très instable et réagit avec diverses molécules dont l' $H_2O$  et mène à la production des *reactive oxygen species* (ROS), des molécules très bioactives. L' $O_2^{\cdot-}$  agit au niveau des voies intracellulaires par l'activation de facteurs de transcription tels NF- $\kappa$ B et AP-1 ainsi que par l'activation des voies MAPKs dont p38 (Hunyady and Catt, 2006). Les ROS, dont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peuvent modifier les résidus cys et interférer avec la fonction biologique des protéines. De plus l' $O_2^{\cdot-}$  peut interagir avec le NO et ainsi inactiver sa fonction dans les cellules endothéliales et les CMLV (Mehta and Griendling, 2007). L'activation des ROS permet d'activer la protéine apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK-1) impliquée dans la phosphorylation des protéines MEK4/7 et MEK3/6 permettant de phosphoryler et activer JNK et p38. Plusieurs protéines distinctes, peuvent phosphoryler les MEK dont MEKK1. L'activation de p38 passe par la transactivation de l'EGFR tandis que l'activation de JNK est peut aussi passer par l'activation de PKC- $\delta$  et induit la stimulation de Pyk-2 et l'activation de Rho (Mehta and Griendling, 2007).

L'activation des MAPKs est impliquée dans l'activité du facteur de transcription AP-1 via l'expression des gènes c-fos (via ERK) et de c-jun (via JNK). En effet, AP-1 est formé d'homodimères ou d'hétérodimères de membres de la famille Jun (c-Jun, Jun B, Jun D) et de la famille Fos (c-Fos, Fos B, Fra1 et Fra2) (Min et al., 2009). Ce facteur de transcription, impliqué dans la différenciation et la migration cellulaire, contient un domaine de transactivation de l'ADN (TAD), un domaine de liaison à l'ADN et des leucines zippers. (Mehta and Griendling, 2007). De plus, l'Ang II initie l'activation de plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans la transcription de gènes

proinflammatoires. En effet, en plus d'activer STAT et AP-1, ce peptide active NF-κB. L'activation de ce facteur de transcription est décrite dans une des sections suivantes.

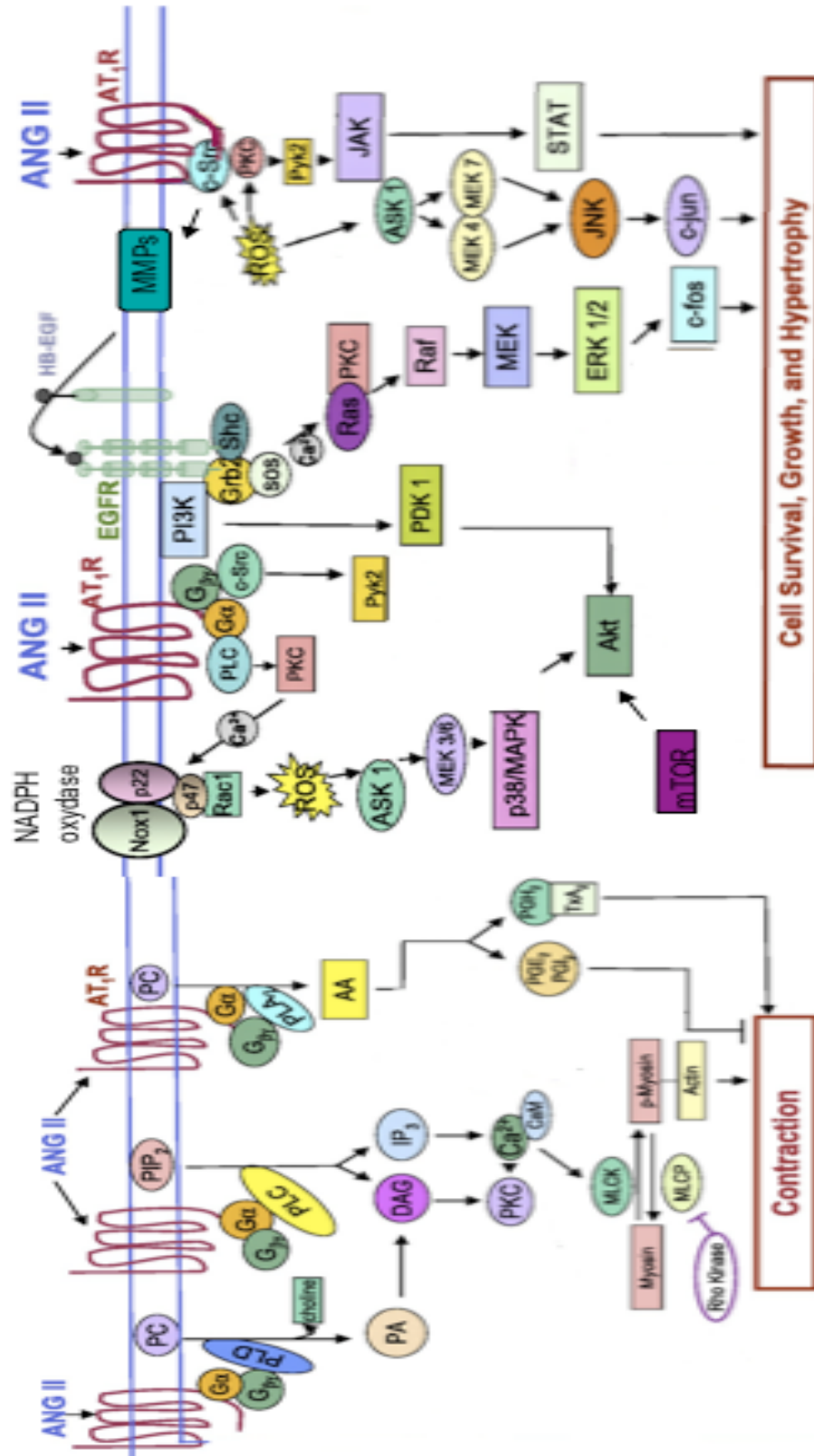


Figure 3 : **Signalisation du AT1R suite à la liaison de son ligand, l'Ang II.** Figure modifiée de (Mehta and Griendling, 2007).

## **1.6 Effets pathophysiologiques de l'Ang II dans le développement de l'athérosclérose**

L'Ang II est une hormone impliquée dans une variété de processus biologiques dont la contraction des CMLV ainsi que le maintien du tonus vasculaire, de la pression sanguine, de la balance sodique et de l'absorption rénale. Un déséquilibre dans la régulation du RAS initie le développement de conditions pathophysiologiques menant au développement de maladies entre autre, l'hypertension artérielle. Le RAS tissulaire est mis de l'avant dans les recherches sur l'athérosclérose puisqu'il est impliqué dans tous les stades du développement de la pathologie passant par les étapes précoces jusqu'aux étapes finales (Mehta and Griendling, 2007). En effet, des études cliniques utilisant des inhibiteurs de l'ACE et du ARB confirment l'implication du RAS dans l'athérosclérose (Brasier et al., 2002).

L'Ang II participe aux étapes précoces du développement de l'athérosclérose en contribuant à la dysfonction de l'endothélium. En effet, l'activation des cellules endothéliales par l'Ang II augmente le stress oxydatif et induit la perte de la relaxation endothéliale. Ces conséquences physiologiques sont associées à la production des ROS, l'inactivation du NO et l'oxydation des LDL. De plus, l'Ang II est impliqué dans l'adhésion des leucocytes circulants. Cet événement est initié par l'activation de NF- $\kappa$ B induisant l'expression de cytokines proinflammatoires et des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM, E-sélectine par les cellules endothéliales. De plus, l'Ang II augmente l'expression des chimiokines dont MCP-1, favorisant la migration des monocytes.

Au niveau des stades plus avancés de la pathologie, soit de la plaque et du cap fibreux, des études démontrent que ce peptide exerce des effets trophiques et proinflammatoires sur les CMLV. Comme mentionné précédemment, ces cellules sont

impliquées dans les étapes intermédiaires et tardives menant au développement de l'athérosclérose. La production de facteurs de croissances dont le PDGF et le TGF- $\beta$  implique l'augmentation de la migration et de la prolifération des CMLV (Brasier et al., 2002). De plus, l'Ang II influence la composition de la MEC. En effet, l'activation des voies MAPKs et de l'EGFR par l'Ang II sont impliquées dans la formation de la MEC via la synthèse des protéines constituant la matrice. De plus, l'Ang II influence l'expression des MMPs. L'accumulation anormale de protéoglycans est visualisée dans les lésions athérosclérotiques. (Mehta and Griendling, 2007).

Les effets pathophysiologiques de l'Ang II, initiées suite au dérèglement du RAS, affectent toutes les cellules vasculaires. Tel qu'énuméré précédemment, l'Ang II active de nombreuses voies de signalisations impliquées dans le développement de l'athérosclérose. Entre autre, l'activation des MAPKs et de NF- $\kappa$ B sont des déterminants importants de cette pathologie. En effet, l'activation de ERK1/2 est observée dans les lésions athérosclérotiques. De plus, l'activation de JNK et ERK est induite dans les parois vasculaires de rats hypertendus. (Li and Xu, 2000). Une seconde étude confirme le rôle de MEKK1, une MAP3K impliquée dans l'hypertrophie cardiaque la survie cellulaire ainsi que l'apoptose dans les pathologies cardiovasculaires. La déficience en MEKK1 dans des CMLV aortiques de souris diminue la phosphorylation des MAPKs JNK et ERK sans influencer p38 suite à une stimulation au FGF résultant en la diminution de la migration des CMLV. (Li et al., 2005).

Les voies de signalisation impliquant le rôle proinflammatoire de NF- $\kappa$ B dans l'athérosclérose sont peu connues. Des études montrent que l'inhibition partielle de la signalisation de NF- $\kappa$ B prévient les pathologies cardiovasculaires. Par contre, l'inhibition complète de NF- $\kappa$ B dans des macrophages cause une athérosclérose plus sévère chez ces souris. Ainsi, la compréhension de la régulation des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B dans l'athérosclérose est primordiale afin de comprendre la balance entre ses effets proinflammatoires et anti-inflammatoires (Li and Zhuo, 2008). L'activation de ces voies de



signalisation est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ainsi, l'étude de ces modifications dans ces voies de signalisation est cruciale à leur compréhension. Ces modifications comprennent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination, et elles influencent le rôle et l'activation des protéines ainsi que le recrutement d'effecteurs protéiques. L'acétylation, soit l'ajout d'un groupement acétyle sur un groupement aminé d'une protéine ou la méthylation, soit l'ajout d'un groupement méthyle sont impliqués dans la régulation de l'expression génique. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle réversible caractérisée par l'ajout d'un groupement phosphate sur un groupement hydroxyle d'une protéine par une protéine kinase. Cette modification est, entre autre, impliquée dans la régulation de l'activation des MAPKs. L'activation de ces voies permet une amplification spécifique du signal résultant en l'activation d'une diversité de voies moléculaires. L'étude des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation dans les voies de signalisation du AT1R a énormément été vérifiée. Récemment, l'implication d'une nouvelle modification post-traductionnelle dans les actions de l'Ang II, soit la polyubiquitination est démontrée.

## 1.7 Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle impliquée dans une diversité de processus biologiques dont la régulation du cycle cellulaire, l'endocytose des récepteurs, la dégradation des protéines et la signalisation cellulaire. Cette modification est caractérisée par la liaison covalente de l'ubiquitine sur un résidu lysine (K ou Lys) d'une protéine cible. Ce processus est initié par l'activation séquentielle de trois familles d'enzymes, l'enzyme activatrice (E1), l'enzyme de conjugaison (E2) et l'enzyme ubiquitine ligase (E3) (Figure 4, page 34). Au départ, la E1 catalyse la formation d'un lien thioester entre le résidu glycine (Gly) 76 de l'ubiquitine et le résidu cystéine (Cys) actif de la E1 de façon ATP dépendante. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée sur un résidu Cys de la E2. Finalement, cette cascade enzymatique est complétée par la liaison covalente entre le

résidu Lys d'une protéine cible reconnue par une E3, et le résidu Gly de l'ubiquitine activée (Pickart, 2001).

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés hautement conservée chez les eucaryotes formée de quatre feuillets  $\beta$  autour d'une hélice, une structure nommée  $\beta$ grasp (Groettrup et al., 2008). L'ubiquitine peut être encodée par quatre gènes, soit UBA52, RPS27A, UBB et UBC. Les ubiquitines encodées par les gènes UBA52 et RPS27A fusionnent avec les sous-unités ribosomales tandis que celles encodées par les gènes UBB et UBC sont impliquées dans la polyubiquitination linéaire (Xu et al., 2009a). Cette protéine contient sept résidus Lys (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) disponibles pour le processus de polyubiquitination, soit l'ajout successif de plusieurs ubiquitines sur le même résidu Lys. La monoubiquitination, soit l'ajout d'une seule ubiquitine par Lys cible, est impliquée dans l'endocytose, le transport intracellulaire et la réparation de l'ADN. La polyubiquitination est impliquée dans de nombreux processus cellulaires selon le type de liaison rencontrée. En effet, l'élongation de la chaîne d'ubiquitine peut être générée à partir de n'importe lequel de ses sept résidus K. Tous ces types de liaisons sont rencontrés dans la cellule. La polyubiquitination en K48 suivi de la polyubiquitination en K11 et en K63 sont les plus abondantes dans la cellule (Adhikari and Chen, 2009). Les fonctions physiologiques des polyubiquitination en K6, K27 et K33 ne sont pas encore élucidées ni celle de la polyubiquitination hétérogène. L'hétérodimère formé du suppresseur de tumeur BRCA1 et de BARD1 contient une activité E3 ligase impliquée dans la polyubiquitination en K6 mais sa fonction est inconnue (Wu-Baer et al., 2003). La polyubiquitination en K11 est impliquée dans la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (Adhikari and Chen, 2009). La polyubiquitination en K29 est impliquée dans la dégradation lysosomale de protéines cellulaires. La polyubiquitination en K48 est la mieux étudiée jusqu'à ce jour. Lors de l'ajout d'au moins quatre ubiquitines en K48 sur une protéine cible, cela permet sa dégradation via le protéasome 26S et l'ubiquitine est recyclée. Les substrats de ce type de modification sont les protéines aberrantes, les protéines mal repliées et la régulation de facteurs de transcriptions et régulateurs du cycle cellulaire. La

polyubiquitination en K48 est essentielle aux fonctions cellulaires puisque la surexpression de la mutation K48R de l'ubiquitine dans la cellule induit sa mort (Adhikari and Chen, 2009). La polyubiquitination en K63 est impliquée dans des fonctions indépendantes du protéasome, soit dans la réparation de l'ADN, la transduction de signal cellulaire, d'endocytose des récepteurs, l'inflammation et de nombreuses autres fonction cellulaires. La grande variété des processus initiés selon le type de liaison rencontrée peut s'expliquer par les différentes conformations adoptées par les chaînes d'ubiquitines. La liaison en K48 adopte une conformation fermée tandis que la liaison en K63 adopte une conformation ouverte (Pickart and Fushman, 2004).

Les fonctions de l'ubiquitination et de la polyubiquitination dépendent de leur reconnaissance par des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBDs). Près de 20 domaines sont connus dont *ubiquitin interacting motifs* (UIM), *ubiquitin-association* (UBA) et *ubiquitin E2 variant* (UEV). Ces domaines de liaisons sont présents dans une diversité de protéines et contribuent à la complexité des voies moléculaires. De plus, comme la phosphorylation, l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle réversible par les deubiquitinases (DUB). Près de 100 DUB sont connus (Skaug et al., 2009). Dans les lignes suivantes, les caractéristiques des enzymes impliquées dans l'ubiquitination sont décrites.

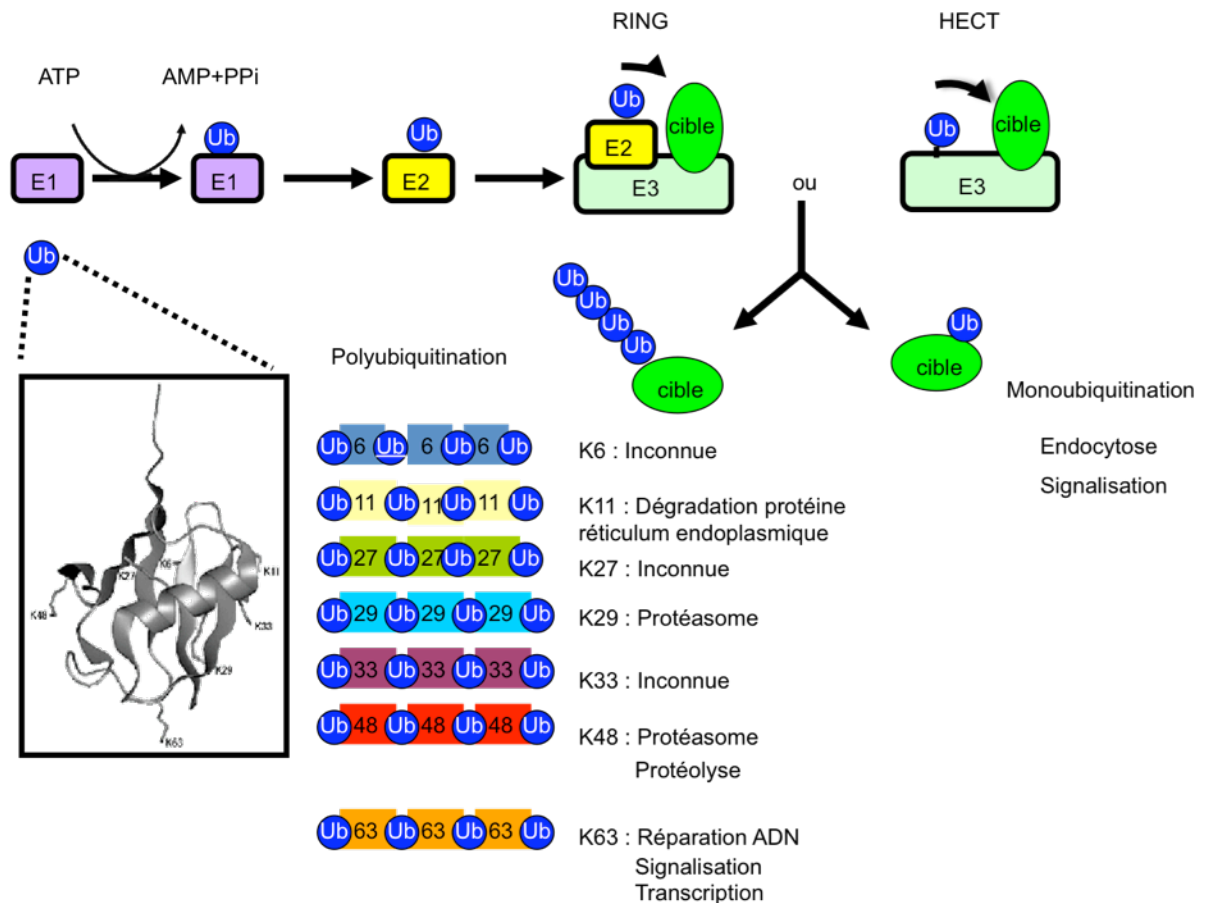


Figure 4 : **Représentation schématique du processus d'ubiquitination.** La figure trois dimensions de l'ubiquitine est tirée de (Raasi, 2009) La distinction entre les E3 RING et HECT est décrite à la section 1.7.3

### 1.7.1 Enzyme d'activation de l'ubiquitine – E1

Pendant de nombreuses années, UBE1 était la seule E1 connu permettant le transfert de l'ubiquitine à la E2. Depuis quelques années une nouvelle E1 ayant l'ubiquitine comme substrat a été découverte, UBA6. Cette enzyme est essentielle à la survie puisque la déficience en UBA6 est létale pour les souris. Ainsi, deux E1 ayant l'ubiquitine comme substrat sont présentement identifiées chez l'humain, UBE1 et UBA6. Ces deux protéines ont une affinité similaire pour l'ubiquitine mais elle partagent une homologie de séquence

de 40% (Schulman and Harper, 2009). Ainsi la possibilité que ces protéines aient une affinité distincte pour les E2 est possible et certains groupes de recherches se penchent sur cette question (Groettrup et al., 2008).

Les E1 sont responsables de la première étape du processus d'ubiquitination via l'activation de l'ubiquitine. Ces enzymes contiennent un domaine d'adénylation responsable de la reconnaissance de l'ubiquitine. L'activation de l'ubiquitine est effectuée via une modification post-traductionnelle, l'adénylation. Cette modification est caractérisée par la formation d'un lien phosphodiester entre un groupement hydroxyle et le groupement phosphate d'une molécule d'AMP. En premier lieu, la E1 catalyse l'adénylation en C-terminal de l'ubiquitine suite à sa liaison à l'ATP et au  $Mg^{2+}$ . Par la suite, la E1 forme un lien thioester avec l'ubiquitine adénylée suite à l'attaque du résidu Cys actif de la E1. Les E1 peuvent ainsi contenir deux molécules d'ubiquitine adénylée de façon asymétrique sur des sites actifs distincts. Une ubiquitine est liée sur la Cys active tandis que l'autre est associée de façon non covalente au domaine d'adénylation (Schulman and Harper, 2009). La vitesse de la réaction permettant le transfert du groupement ubiquitine sur la E2 dépend de l'adénylation de l'ubiquitine ainsi que de la présence d'ATP et de  $Mg^{2+}$ .

### **1.7.2 Enzymes de conjugaison de l'ubiquitine – E2**

Les E2 sont responsables de la seconde étape de l'ubiquitination, soit du transfert de l'ubiquitine vers la E3 (E3 de type HECT) ou directement sur la protéine cible (E3 de type RING). Cette étape est spécifiée selon le domaine de la E3 (voir section 1.7.3 page 36). Actuellement, environ 50 E2 sont répertoriées (Bhoj and Chen, 2009). Toutes ces enzymes partagent un domaine central conservé de 150 acides aminés nommé Ubc, contenant un résidu Cys actif impliqué dans le processus d'ubiquitination. Les E2 sont divisées en quatre classes selon leur structure. La classe I contient seulement le domaine Ubc, la classe II contient le domaine Ubc et un domaine N-terminal, la classe III contient le domaine Ubc et un domaine C-terminal et la classe IV possède des domaines N et C terminal en plus du domaine Ubc. Ces extrémités peuvent faciliter les interactions spécifiques avec la E3.

Malgré cette distinction, la structure tridimensionnelle du domaine Ubc est conservée à travers les quatre classes. La majorité des E2 font parties de la classe I (Christensen and Klevit, 2009). Certaines caractéristiques permettent de distinguer ces classes. Entre autre, les E2 de classe III, tel UbcM2, UbcH5 et Ube2E2, sont reconnu par l'importine-11 et permet sa translocation du cytoplasme vers le noyau et vice-versa (Zhang and Matunis, 2005).

De récentes études démontrent que différentes E2 peuvent être impliquées dans la polyubiquitination d'un même résidu Lys d'une protéine cible. En effet, certaines E2 catalysent la monoubiquitination tandis que d'autres sont impliquées dans l'élongation de la chaîne par l'ajout successif d'autres ubiquitines. Des recherches *in vitro* démontrent, en surexpression, que le complexe E2-Ubc5a/E3-CHIP est impliqué dans la monoubiquitination de CHIP. Par contre, le complexe E2-Ubc13-Uev1A/E3-CHIP n'est pas un substrat de CHIP mais est plutôt impliqué dans la formation spécifique des chaînes de polyubiquitination en K63. Des résultats similaires sont obtenus avec la E3 TRAF6 (Windheim et al., 2008).

### 1.7.3 Enzyme ubiquitine ligase – E3

Le protéome humain contient des centaines de E3 ligase. Présentement, 600 sont relevées. La conformation active des protéines E3 peut être sous forme d'homodimère, d'hétérodimère, de complexe protéique ou la protéine seule. Une E3 peut interagir avec une diversité de E2 augmentant la complexité du processus d'ubiquitination. Des études réalisées sur la E3 BRCA1/BARD1 démontrent son interaction avec 10 E2 distinctes menant toutes à des réponses biologiques différentes. Deux familles de protéines E3 sont distinguées selon leur domaine, les domaines *Homologous to the E6-AP carboxy terminus* (HECT) et les *really interesting new gene* (RING) et elles agissent de façon distincte dans le processus d'ubiquitination. Les HECT contiennent un résidu Cys actif impliqué dans la formation d'un lien thiolester avec l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur la protéine cible. Les RING, sont reconnus comme la plus grande

famille de E3 ligase. Ces enzymes ne possèdent pas de résidu Cys actif et sont impliqués dans la reconnaissance de la protéine cible (Figure 4, page 34). Cette interaction permet la proximité entre la E2 et la protéine cible. L'ubiquitine est ensuite transférée directement sur le résidu lysine de la protéine cible par la E2 (Christensen and Klevit, 2009).

#### 1.7.4 Deubiquitinases - DUB

L'ubiquitination est une modification impliquée dans l'activation d'une variété de fonctions cellulaires ainsi, des mécanismes cellulaires sont mis en place afin de s'assurer de sa régulation. Comme pour les mécanismes de phosphorylation, régulés par les phosphatases, l'ubiquitination est régulée par les DUB. La majorité des DUB agissent via leur activité cystéine protéase. Deux DUB, *cyclindromatosis tumor suppressor protein* (CYLD) et A20, sont importantes dans les voies de signalisations menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. L'activation de NF- $\kappa$ B sera discutée à la section suivante. CYLD est un suppresseur de tumeur impliqué dans de nombreuses maladies humaines et contient trois domaines conservés protéines glycines associées au cytosquelette (CAP-GLY) suivi d'un domaine catalytique protéase spécifique à l'ubiquitine. CYLD clive les chaînes de polyubiquitination en K63 de façon très spécifiques prévenant ainsi l'activation de TAK1, JNK et IKK dans diverses voies de signalisation (Bhoj and Chen, 2009). CYLD peut prévenir l'activation de NF- $\kappa$ B via la déubiquitination de TRAF6 (Petroski, 2008). Des souris exprimant une forme mutée de CYLD présentent une hyperactivation du complexe IKK associée à des phénomènes inflammatoires (Bhoj and Chen, 2009). A20 est un inhibiteur de NF- $\kappa$ B et contient un domaine ovarian tumor (OTU)-DUB suivi de sept domaines en doigts de zinc (ZF). *In vitro*, A20 clive autant les chaînes en K48 qu'en K63 (Bhoj and Chen, 2009). A20 est impliqué dans le clivage de la chaîne d'ubiquitine en K63 de RIP1 dans la voie du TNF $\alpha$  tandis que la partie C-terminale est impliquée dans l'élongation de chaîne en K48 de RIP1, le ciblant à la dégradation via le protéasome (Bhoj and Chen, 2009; Skaug et al., 2009).

### 1.6.5 Pathologies associées au système d'ubiquitination

L'ubiquitination est impliquée dans de nombreux processus cellulaires ainsi, le bon fonctionnement de cette modification dans les voies moléculaires est primordial afin d'assurer ses fonctions biologiques. Entre autre, l'ubiquitination est impliquée dans l'endocytose des récepteurs, processus impliqué dans la régulation de l'activation des voies de signalisation. Lors de l'activation de l'EGFR, la transphosphorylation des résidus tyrosines dans sa queue cytoplasmique mène au recrutement de protéines contenant des domaines SH2 dont la E3 *Casitas B-lineage lymphoma protooncogene* (Cbl). Cbl permet la monoubiquitination de l'EGFR qui est reconnu par des protéines contenant un domaine UIM dont Epsin et EPS15 impliquées dans le processus d'endocytose (Seet et al., 2006). Une dérégulation de ce phénomène cellulaire impliquerait une hyper activation du récepteur et occasionnerait de nombreux effets dus à son rôle dans l'activation de voies de croissance cellulaire.

De nombreuses pathologies sont maintenant associées à une dérégulation du système d'ubiquitination dont le cancer, les infections, le diabète de type 2 et les maladies neurodégénératives. La diversité des communications entre les E2 et les E3 ainsi que les différents chaînes de polyubiquitination possibles des protéines augmentent la complexité des recherches entreprises sur cette modification post-traductionnelle. Le rôle de l'ubiquitination dans le contrôle de la prolifération cellulaire en a fait un candidat de choix dans l'étude du cancer. Des recherches démontrent l'implication de l'ubiquitination dans la dégradation de p53, un facteur de transcription impliquée dans 50% des tumeurs observées. Normalement, dans la cellule, la liaison de la E3 ligase MDM2 à p53 permet sa dégradation via son activité ligase (Petroski, 2008). Ainsi, une défectuosité des processus menant à l'ubiquitination de p53 augmente sa stabilité et influence la régulation du cycle cellulaire.

L'ubiquitination est aussi un système cellulaire utilisé par divers pathogènes afin de contourner l'action du système immunitaire de l'hôte. En effet, suite à l'infection d'une cellule par l'*herpes virus*, celui-ci encode pour deux protéines ligases, K3 (MIR1) et K5



(MIR2). Ces protéines influencent le processus d'ubiquitination de l'hôte à leur profit en causant une diminution de l'expression de récepteurs immunitaires à la surface cellulaire. Peu d'informations sont connues sur les mécanismes empruntés par les protéines K3 et K5. Cependant, une étude démontre, par l'utilisation d'ARN interférents (siARN), l'implication des E2 Ubc13 et UbcH5b/c dans la diminution de l'expression du CMH de classe 1 par K3 (Petroski, 2008).

Actuellement, une seule drogue ciblant cette modification post-traductionnelle est mise sur le marché, le Velcade. Cet inhibiteur réversible de l'activité chymotrypsine du protéasome 26S est utilisé dans le traitement contre les myélomes multiples (Nalepa et al., 2006). Ce composé pharmacologique interfère au niveau de la dégradation des protéines polyubiquitinées en K48 via le protéasome. Certaines de ces protéines sont impliquées dans le cycle cellulaire ayant pour conséquence une augmentation de la prolifération des cellules tumorales et l'induction de l'apoptose. Une nouvelle drogue, le nutlins est présentement en évaluation clinique. Ce traitement potentiel permet d'interférer avec l'ubiquitination de p53 via MDM2 provoquant l'apoptose des cellules tumorales (Petroski, 2008). Tel que noté précédemment, l'ubiquitination est impliqué dans une panoplie de maladies. Cependant, l'étude de l'implication de l'ubiquitination dans le système cardiovasculaire n'est qu'à son début. L'ubiquitination est un phénomène important dans la régulation de la signalisation du facteur de transcription proinflammatoire NF- $\kappa$ B. En effet, cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la dégradation de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  via sa polyubiquitination en K48. Ensuite, elle est impliquée dans la protéolyse dépendante du protéasome des sous-unités de NF- $\kappa$ B, p100 et p105. De plus, la polyubiquitination de la sous-unité NEMO, du complexe IKK, est indispensable à l'activation de NF- $\kappa$ B dans certaines voies de signalisation (Skaug et al., 2009). La compréhension des voies moléculaires impliquées dans la polyubiquitination de protéines dans les voies de signalisation de l'Ang II pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. La régulation de l'activation de NF- $\kappa$ B et l'implication de l'ubiquitination sont décrites plus en détail dans la section suivante.

## 1.8 Facteur de transcription NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription présent dans tous les types cellulaires et identifié depuis un peu plus de 20 ans. Il est au centre des recherches dû à son implication dans une diversité de processus biologiques comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réponse immunitaire et l'inflammation. NF- $\kappa$ B est composé d'homodimères ou d'hétérodimères de la famille Rel; p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, RelB. Ces membres possèdent tous un domaine d'homologie Rel en N-terminal (RHD) impliqué dans la liaison à l'ADN ainsi que dans leur dimérisation. De plus, les sous-unités p65, c-Rel et RelB possèdent un domaine d'activation de la transcription (TAD) responsable de l'activation de l'expression de gènes. L'hétérodimère le plus fréquemment rencontré est formé des sous-unités p50 et p65. NF- $\kappa$ B est régulé par huit membres de la famille I $\kappa$ B dont I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , BCL-3, I $\kappa$ B $\zeta$  et les précurseurs p100 et p105. La présence de cinq à sept motifs ankyrines répétés caractérise les membres de la famille I $\kappa$ B. Ces motifs permettent leurs interactions avec le domaine RHD des protéines Rel. I $\kappa$ B $\alpha$  masque la séquence de localisation nucléaire de p65 et le séquestre au cytoplasme. L'inhibition peut être levée suite à la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  par le complexe *I kappa B kinase* (IKK). Ce complexe protéique est formé de deux sous-unités catalytiques homologues, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  ainsi que d'une sous-unité régulatrice, *NF- $\kappa$ B essential modulator* (NEMO), aussi nommée IKK $\gamma$ . NF- $\kappa$ B est activé par une variété de stimuli distincts dont des cytokines proinflammatoires tel le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'EGF et par divers pathogènes (Hayden and Ghosh, 2008). Des voies de signalisations distinctes sont rencontrées selon l'agoniste et le type cellulaire. On peut distinguer trois voies de signalisation de NF- $\kappa$ B, la voie classique, la voie alternative et la voie atypique.

## 1.8.1 Activation de NF- $\kappa$ B

### 1.8.1.1 Voie d'activation classique de NF- $\kappa$ B

Ce mode d'activation est le plus fréquemment rencontré. La voie classique d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est engendrée suite à une stimulation au TNF $\alpha$ , à l'IL-1 $\beta$ , au LPS ou au *phorbol 12-myriotate-acetate* (PMA) sur leurs cibles respectives. Cette voie est dépendante de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  en N-terminal par le complexe IKK en Ser32 et Ser36 conduisant, par la suite à sa polyubiquitination en K48 sur ses résidus K21 et K22. Cette modification est initiée suite au recrutement du complexe E3 ligase  $\beta$ TrCP Skp1-Culin-Roc1Rbx1Hrt-1-F-box (SCF) (Schmid and Birbach, 2008). Ces modifications post-traductionnelles mènent à la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  via le complexe 26S du protéasome. Une fois libéré, NF- $\kappa$ B peut s'accumuler au noyau et transcrire les gènes ayant des éléments de réponse kappaB dans leur promoteur (Figure 5A, page 43). Cela mène au recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base et des coactivateurs CBP/p300 ayant une activité *histone acetyl transférase* (HAT). Un des gènes régulés par NF- $\kappa$ B est son inhibiteur, I $\kappa$ B $\alpha$ , lequel mène à une boucle de rétroactivation négative. Cette boucle est impliquée dans la durée de l'activation de NF- $\kappa$ B puisque I $\kappa$ B $\alpha$  lie NF- $\kappa$ B actif au noyau puis NF- $\kappa$ B est retourné au cytoplasme où il est séquestré (Hayden and Ghosh, 2008; Skaug et al., 2009).

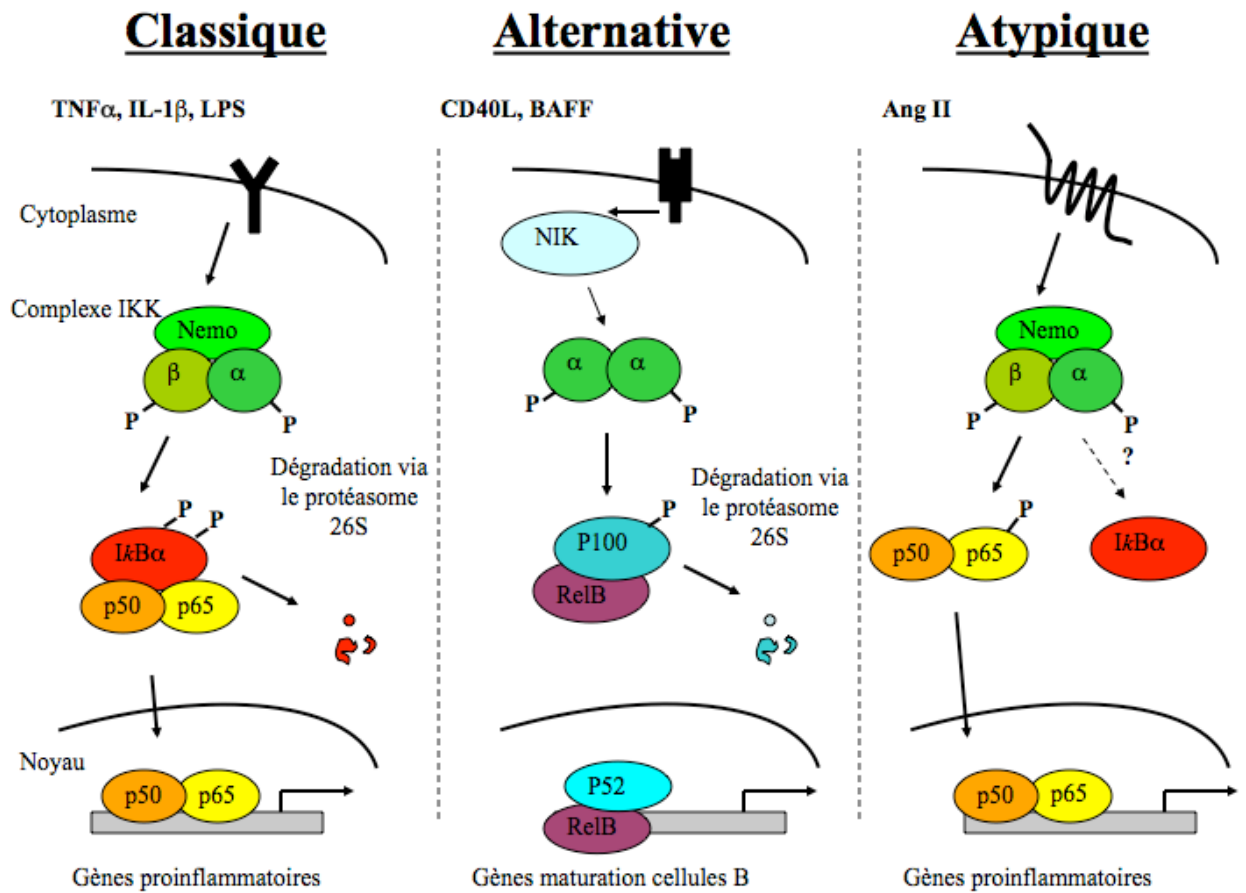
### 1.8.1.2 Voie d'activation alternative de NF- $\kappa$ B

La voie alternative, retrouvée dans les cellules B, implique la formation de p52 suite à la dégradation de la sous-unité p100 (Figure 5B, page 43). L'activation des récepteurs CD40 et le récepteur du *B Cell Activating Factor* (BAFF) par leurs ligands respectifs le CD40L et le BAFF, mène à l'activation de *NF- $\kappa$ B inducing kinase* (NIK) qui induit la phosphorylation du complexe IKK, composé de deux sous-unités IKK $\alpha$ . L'activation du complexe IKK mène à la phosphorylation de p100 sur deux résidus Ser en C-terminal suivi de sa polyubiquitination en K48 par  $\beta$ TrCP SCF et une E2 de la famille Ubc45 ce qui

permet la protéolyse de la protéine en p52 de façon dépendante du protéasome et au relargage de l'hétérodimère p52/RelB. L'activation de l'hétérodimère mène à la transcription de gènes impliqués dans la maturation des cellules B. La protéolyse de p105 en p50 est initiée par un processus similaire, soit dépendante du protéasome. Cette dégradation est contrôlée par une région riche en Gly retrouvée dans les sous-unités p100 et p105 (Chen, 2005; Hayden and Ghosh, 2008; Skaug et al., 2009). En effet, la dégradation en N-terminale est abrogée dû à la stabilité des structures tertiaires formées au niveau de la région riche en Gly (Skaug et al., 2009).

### **1.8.1.3 Voie d'activation atypique de NF- $\kappa$ B**

Les recherches effectuées par le groupe du Dr. Servant jusqu'à maintenant démontrent que les voies classiques et alternatives d'activation de NF- $\kappa$ B ne sont pas activées par l'Ang II. En effet, bien que le complexe IKK soit activé en réponse à l'Ang II et qu'il y ait une augmentation de la transcription de gènes normalement modulés par NF- $\kappa$ B comme l'IL-6 et MCP-1, aucune dégradation de la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  n'est observée. L'équipe du Dr. Servant a donc proposé un modèle (Figure 5C, page 43) où la phosphorylation de p65 sur le résidu Ser536 par le complexe IKK est impliquée dans les effets proinflammatoires du peptide dans les CMLV. Les mécanismes moléculaires menant à la dissociation de l'hétérodimère p65/p50 et de son inhibiteur, I $\kappa$ B $\alpha$ , en réponse à l'Ang II ne sont pas élucidés. Cependant, la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  n'est pas observée dans des CMLV exposées à l'Ang II (Douillette et al., 2006). Un groupe de recherche a obtenu des résultats similaires, soit la phosphorylation directe de p65 (Li and Zhuo, 2008). De plus, dans leur étude, aucune dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  n'est visualisée (Li and Zhuo, 2008). Par contre, les protéines effectrices menant à l'activation de NF- $\kappa$ B par l'Ang II suscite, encore aujourd'hui, la controverse et de nombreux mécanismes sont à découvrir.



**Représentation schématique de trois voies d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.** A) Voie classique ou canonical, B) Voie alternative ou non-canonical, C) Voie atypique.

## 1.8.2 Activation du complexe IKK

### 1.8.2.1 Composants et formation du complexe IKK

Les voies d'activation de NF- $\kappa$ B convergent toutes à l'activation du complexe protéique IKK. Dans les voies classiques et atypiques, IKK est formé des sous-unités  $IKK\alpha$ ,  $IKK\beta$  et NEMO cependant, dans la voie alternative, le complexe IKK est formé de sous-unités  $IKK\alpha$ .  $IKK\alpha$  et  $IKK\beta$  possèdent une structure similaire partageant une homologie de séquence de 50%. Ces sous-unités possèdent un domaine kinase (KD), des

motifs leucine zipper (LZ), un motif hélice boucle hélice ainsi qu'un domaine de liaison à NEMO (NBD). Deux caractéristiques permettent de distinguer ces sous-unités. Premièrement, IKK $\alpha$  possède une séquence de localisation nucléaire. Ensuite, l'affinité de IKK $\beta$  pour NEMO est plus forte. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  semblent former préférentiellement un hétérodimère *in vivo et in vitro* par la liaison de leur domaine LZ (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009). NEMO contient un domaine de liaison aux kinases (KBD), des motifs LZ, un motif ZF et un UBD. NEMO est sous forme d'homodimère de façon constitutive. La liaison du dimère IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  à NEMO est effectuée par la liaison des domaine NBD-KBD tandis que l'extrémité C-terminal libre de NEMO permet son interaction avec des partenaires protéiques entre autre via son UBD. Les acides aminés impliqués dans l'interaction de NEMO avec IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  via son KBD sont différents selon les sous-unités. La sous-unité NEMO est essentielle à la formation du complexe protéique. Le complexe IKK contient quatre sous-unités catalytiques ainsi que quatre sous-unités régulatrices. De plus, le complexe IKK peut être associé avec d'autres protéines. Les plus connues sont la chaperone HSP-90 ainsi que ELKS mais la fonction de ces protéines ne sera pas discutée dans ce mémoire (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

Dans les voies d'activation de NF- $\kappa$ B, diverses sous-unités du complexe IKK sont requises selon l'agoniste. Dans la voie classique d'activation de NF- $\kappa$ B, la majorité des études démontrent le rôle critique de IKK $\beta$  dans l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, des études *in vivo* démontrent que la déficience en IKK $\beta$  dans des souris est similaire à celui de p65, suggérant son implication dans l'activation de NF- $\kappa$ B (Hayden and Ghosh, 2008). D'autres études démontrent qu'en l'absence de IKK $\beta$ , IKK $\alpha$  peut activer NF- $\kappa$ B en réponse à l'IL-1 $\beta$  mais pas au TNF $\alpha$  (Hayden and Ghosh, 2008; Solt et al., 2007). Cependant, les souris déficientes en IKK $\alpha$  survivent au développement embryonnaire mais meurent peu de temps après la naissance due à des défauts lors du développement squelettique et épidermique entraînant des malformations morphologiques (Hayden and Ghosh, 2008). La sous-unité NEMO est essentielle à l'activation du complexe IKK dans toutes les voies de signalisation

classiques de NF- $\kappa$ B. Des souris déficientes en NEMO meurent au stade embryonnaire suite à l'apoptose des cellules hépatiques. Ces études *in vivo* démontrent l'importance du complexe IKK dans le développement embryonnaire ainsi que dans l'activation de NF- $\kappa$ B. Dans la voie alternative, c'est la sous-unité IKK $\alpha$  qui est impliquée dans la phosphorylation de p100, menant à sa dégradation en p52. Les sous-unités IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  exercent aussi des rôles indépendants de la fonction de NF- $\kappa$ B mais ceux-ci ne sont pas discutés dans ce mémoire (Hayden and Ghosh, 2008; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

### 1.8.2.2 Activation du complexe IKK

Dans la voie classique, l'activation du complexe IKK nécessite la phosphorylation en résidus Ser177 et Ser181 de la boucle d'activation (T loop) de la sous-unité catalytique IKK $\beta$  (Shambharkar et al., 2007). Les kinases TAK1, NIK, NAK et PKC $\theta$  peuvent induire cette phosphorylation. Une autre hypothèse à la phosphorylation de ce T loop, soit la transphosphorylation des sous-unités catalytiques causée par un changement de conformation du complexe a été proposée (Schmid and Birbach, 2008). De plus, une nouvelle modification post-traductionnelle, soit la polyubiquitination en K63 de NEMO est impliquée dans l'activation du complexe IKK par certains agonistes. Afin de réguler l'activation du complexe, la phosphorylation du KBD de NEMO en Ser68 provoque sa dissociation de IKK. De plus, la phosphorylation du NBD de IKK permet d'augmenter cette dissociation entre NEMO et IKK (Hayden and Ghosh, 2008).

Au niveau des facteurs classiques de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, de nombreuses protéines effectrices impliquées dans l'activation du complexe IKK sont maintenant connues. La phosphorylation et la polyubiquitination sont des modifications post-traductionnelles impliquées dans l'activation du complexe IKK et de ses effecteurs protéiques. Ainsi, l'étude de la régulation de ces voies par ces modifications post-traductionnelles est une bonne avenue afin d'expliquer les effets proinflammatoires et hypertrophiques de NF- $\kappa$ B. Les avancés sur les voies de certains récepteurs du système immunitaire ainsi que des GPCR sont décrits dans les lignes suivantes.

### 1.8.2.2.1 Voie d'activation du complexe IKK dans le système immunitaire

#### 1.8.2.2.1.1 Activation du complexe IKK via le TNFR

Le TNF $\alpha$  est un effecteur majeur de la réponse immunitaire innée via l'activation classique de NF- $\kappa$ B. Cette cytokine initie ses effets biologiques majoritairement par la liaison au TNFR1. La liaison d'un trimère de TNF $\alpha$  au TNFR1 induit la trimérisation du récepteur puis mène au recrutement de la protéine adaptatrice *TNF receptor-associated death domain* (TRADD) ainsi que des protéines TRAF2, TRAF5, *receptor associated protein* (RIP1) et *cellular inhibitor of apoptosis protein* (cIAPs). Récemment, une étude démontre que la polyubiquitination de RIP1, catalysée par la E2, Ubc5c et la E3 cIAP, mène au recrutement et à l'activation de la protéine kinase TAK1 par la liaison de TAB2 via son UBD. TAK1 phosphoryle IKK $\beta$  dans son T loop et induit l'activation du complexe IKK (Figure 6A, page 51). De plus, le TNF $\alpha$  induit la polyubiquitination de NEMO mais les mécanismes précis sont inconnus. Une étude publiée en 2003 suggère que cIAPs et Ubc5c sont impliquées dans ce phénomène (Tang et al., 2003).

En réponse au TNF $\alpha$ , des études démontrent la polyubiquitination de TRAF2 et de RIP1 en K63 (Ea et al., 2006; Li et al., 2009; Newton et al., 2008). Par contre, la polyubiquitination en K63 n'est pas impliquée dans l'activation de IKK par le TNF $\alpha$ . En effet, une équipe de recherche utilisant des cellules exprimant une version mutée de l'ubiquitine, K63R, démontre que ce type de polyubiquitination n'est pas impliqué dans l'activation du complexe IKK par des essais kinase IKK *in vitro* (Xu et al., 2009a). Cela révèle ainsi une fonction indépendante du protéasome distincte de la liaison en K63 dans l'activation de IKK par le TNF $\alpha$ . La protéine RIP1 peut être impliquée dans l'activation de IKK puisque dans cette même étude, la polyubiquitination de RIP1 est révélée dans des cellules exprimant le mutant K63R. Une équipe démontre que la phosphorylation de TRAF2 suite à l'activation du TNFR1 peut mener au recrutement de TAK1 et IKK (Li et al., 2009). Le rôle essentiel d'Ubc5c dans l'activation de IKK dans la voie du TNF $\alpha$  est démontré. Une équipe a produit un système inductible à la tétracycline dans lequel



l'expression protéique d'Ubc5c est diminuée par un shARN contre Ubc5c puis ces cellules sont mises en présence ou non de TNF $\alpha$  et son rôle essentiel dans l'activation du complexe IKK a été démontré par la réalisation d'essais kinase IKK *in vitro* (Xu et al., 2009a). Les rôles de la polyubiquitination de TRAF2 sont encore inconnus mais des études suggèrent son implication dans les voies des MAPKs via l'activation de MEKK1 et ASK. (Bhoj and Chen, 2009; Chen and Goeddel, 2002; Xu et al., 2009a).

#### 1.8.2.2.1.2 Voie d'activation du complexe IKK via l'IL-1 $\beta$ R

L'IL-1 $\beta$  est impliquée dans la réponse inflammatoire et est sécrétée par divers types cellulaires dont les monocytes. Suite à la liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur, IL-1 $\beta$ R, cela mène au recrutement de MyD88 via son domaine TIR au récepteur, puis au recrutement de la protéine IRAK4 qui, à son tour recrute, phosphoryle et active IRAK1 et IRAK2. Ces dernières sont responsables de l'oligomérisation de TRAF6, ce qui catalyse son autopolyubiquitination en K63 via son activité E3 ligase avec la E2 Ubc13/Uev1A. Cet événement mène au recrutement des protéines TAB2, TAB3 et NEMO via leur UBD recrutant respectivement TAK1 et le complexe IKK. L'activation de TAK1 par son autophosphorylation active le complexe IKK par la phosphorylation de IKK $\beta$  dans son T loop (Figure 6B, page 51). De plus, TAK1 agit sur les MAPKs par la phosphorylation de MKK6 et de MKK7 menant à l'activation de JNK et p38. Une étude démontre que la polyubiquitination en K63 est essentielle à l'activation du complexe IKK dans la voie de l'IL-1 $\beta$  par la réalisation d'un essai kinase IKK dans un système cellulaire inductible à la tétracycline dans lequel l'ubiquitine est remplacée par un mutant de l'ubiquitine K63R (Xu et al., 2009a). Par l'utilisation de cellules B déficientes en Ubc13, une équipe démontre qu'Ubc13 est essentielle à l'activation des MAPKs dans les voies de l'IL-1 $\beta$  (Yamamoto et al., 2006b). IRAK1 est aussi polyubiquitinée en K63 suite à la liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur. L'ubiquitination de NEMO est dépendante d'Ubc13 dans cette voie moléculaire (Yamamoto et al., 2006a). Les voies de signalisation des *toll like receptor* (TLR), impliquées dans la reconnaissance des pathogènes sont similaires à celle des IL-1R (Bhoj

and Chen, 2009; Xu et al., 2009a). Dans la voie des TLR, suite à un traitement au LPS, l'ubiquitination de NEMO n'est pas essentielle à l'activité de NF- $\kappa$ B (Ni et al., 2008). Cependant, la polyubiquitination de NEMO en K392 est impliquée dans l'activation de JNK suite à un traitement au LPS ou à l'IL-1 $\beta$  dans des fibroblastes (Yamamoto et al., 2006a).

#### 1.8.2.2.1.3 Voie d'activation du complexe IKK via le TCR

Dans le système immunitaire adaptatif, l'activation du TCR suite à la reconnaissance d'un antigène par le CMH, engendre l'activation de la sérine thréonine kinase PKC $\theta$ . La phosphorylation de *caspase recruitment domain membrane-associated gyanilate kinase* (Carma1) par PKC $\theta$  implique la formation d'un complexe protéique près du récepteur composé de Carma1, BCL-10 et MALT1 impliqué dans l'activation du complexe IKK. MALT1 recrute la E3 TRAF6, provoque son oligomérisation et induit son activité ligase. Les protéines cibles de TRAF6 connues sont BCL-10, MALT1, TRAF6 elle-même et NEMO. Comme précédemment, la polyubiquitination est impliquée dans le recrutement et l'activation de TAK1 et du complexe IKK. TAK1 phosphoryle le T loop de IKK $\beta$  (Figure 6C, page 51). Le processus menant à l'ubiquitination de NEMO est peu compris. Par contre, l'ablation conditionnelle de TAK1 et d'Ubc13 dans des tissus précis chez des souris diminue l'activation de IKK et des MAPKs suite à l'activation du TCR dans des thymocytes (Bhoj and Chen, 2009; Skaug et al., 2009). Deux hypothèses sont émises sur le mécanisme menant la modification de NEMO. Deux études proposent que l'ubiquitination de NEMO soit dépendante d'Ubc13 mais la E3 ligase responsable diffère. L'une cible TRAF6 tandis que l'autre étude suggère que MALT1 serait la protéine responsable. Par contre, aucun domaine E3 connu n'est retrouvé dans la séquence de MALT1. De plus, des études démontrent l'implication de TRAF6 dans l'activation de IKK par l'utilisation de siARN (Chen, 2005; McAllister-Lucas et al., 2007; Skaug et al., 2009). L'ubiquitination de NEMO est nécessaire à l'activité maximale de NF- $\kappa$ B puisque l'étude

du mutant K392R de NEMO ou de cellules déficientes en Ubc13 présentent une activité partielle de NF- $\kappa$ B (Ni et al., 2008).

#### 1.8.2.2.2 Voie d'activation du complexe IKK par un GPCR

##### 1.8.2.2.2.1 Voie d'activation du complexe IKK via le récepteur du LPA

L'acide phosphatidique (LPA) est un glycérophospholipide actif retrouvé dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les CMLV. Ce ligand induit l'activation de voies moléculaires suite à sa liaison à un GPCR spécifique. Le LPA est impliqué dans divers processus biologiques dont la prolifération et la survie cellulaire. Des études *in vitro* ont identifiées les joueurs clés liés à l'activation du complexe IKK dans cette voie de signalisation (Figure 6D, page 51). Au départ, la liaison du LPA à son GPCR active la protéine hétérotrimérique G qui permet une activation de la PKC impliquée dans la phosphorylation de IKK $\beta$  via l'activation de MEKK3 (Sun et al., 2009). De plus, l'activation du récepteur permet le recrutement de la  $\beta$ -arrestin2 au niveau de la queue cytoplasmique. La  $\beta$ -arrestine 2 recrute la protéine d'échafaudage Carma3 via son domaine CARD. Le recrutement de Carma3 mène à la formation d'un complexe protéique composé de MALT1, BCL-10 et TRAF6 impliqué dans la polyubiquitination du complexe IKK. La distinction de deux voies moléculaires distinctes menant à l'activation du complexe IKK via sa phosphorylation et sa polyubiquitination est connue depuis peu. Des études *in vitro* dans des *mouse embryonic fibroblast* (MEF) déficientes en  $\beta$ -arrestine2, Carma3, BCL-10 ou TRAF6 démontrent que ces protéines sont essentielles à l'activation du complexe IKK et de NF- $\kappa$ B, mais selon une voie indépendante de la phosphorylation de IKK $\beta$  (Sun and Lin, 2008). De plus, d'autres études confirment ce fait pour Carma3 (Grabiner et al., 2007) et BCL-10 (Klemm et al., 2007) selon une même approche.

Afin de cerner la protéine impliquée dans la phosphorylation de IKK $\beta$ , deux protéines de la famille des MAP3K étaient des candidats cibles dans les études dans les voies du LPA, soit TAK1 et MEKK3, dû à leur implication déjà reconnue dans la

régulation de l'activité de NF- $\kappa$ B via l'activation du complexe IKK (Sun et al., 2009). Par l'utilisation de MEF déficientes en MEKK3, la perte de phosphorylation de IKK $\beta$  est visualisée tandis qu'aucun changement n'est observé dans des MEF déficientes en TAK1. Fait important à noter, dans cette dernière étude, aucune dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  n'est observée suite à l'activation de NF- $\kappa$ B tel qu'obtenu par l'équipe du Dr. Servant dans l'activation de NF- $\kappa$ B par l'Ang II (Sun et al., 2009). Elle suggère que la voie MEKK3 permettrait la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  et sa dissociation de NF- $\kappa$ B permettant la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau sans induire sa dégradation. Dans la voie du LPA, l'activation du complexe IKK est initiée par la phosphorylation de IKK $\beta$  ainsi que la polyubiquitination de NEMO. Ces modifications post-traductionnelles sont associées à des voies de signalisation distinctes, soit l'une passant par MEKK3 et l'autre dépendante d'un complexe protéique recruté par Carma3.

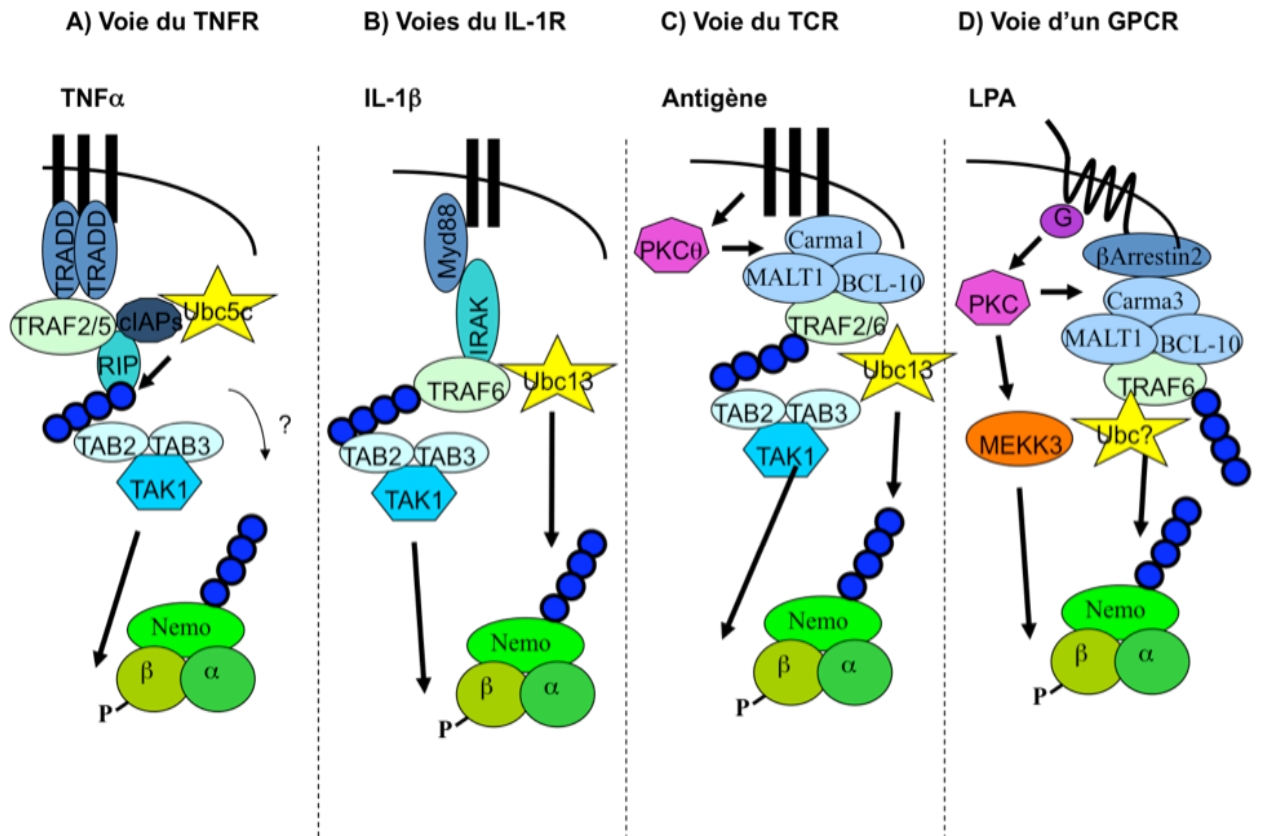


Figure 6 : **Protéines effectrices impliquées dans l'activation du complexe IKK selon divers ligands.** A) TNFR B) IL-1R C) TCR, D) GPCR du LPA.

#### 1.8.2.2.2.2 Voie d'activation du complexe IKK par le récepteur AT1 de l'Ang II

Au niveau du AT1R, les protéines impliquées dans l'activation du complexe IKK restent inconnues. De récentes études confirment l'implication du complexe protéine Carma3, BCL-10 et MALT1 dans l'activation de NF- $\kappa$ B par l'Ang II, tel qu'identifié dans la voie du LPA (McAllister-Lucas et al., 2007; Sun and Lin, 2008). En effet, la diminution de l'expression de l'une de ces protéines par siARN ou l'utilisation de dominants négatifs abolie l'activation de NF- $\kappa$ B dans des hépatocytes exposées à l'Ang II. De plus, cette étude démontre que l'ubiquitination de NEMO suite à un traitement à l'Ang II est dépendante de Carma3 (McAllister-Lucas et al., 2007). Pour l'instant, selon la littérature disponible, diverses hypothèses sont émises quant aux protéines impliquées dans la phosphorylation de

IKK $\beta$  et de la polyubiquitination de NEMO. Au niveau de la phosphorylation de IKK $\beta$ , les MAP3K TAK1 et MEKK3 sont des candidats possibles tandis que pour l'ubiquitination de NEMO, ce sont les protéines MALT1 et TRAF6. Aucune donnée ne permet de discerner si les modifications post-traductionnelle du complexe IKK sont dépendantes de deux voies distinctes (tel le LPA) ou d'une seule voie (tel l'IL-1 $\beta$ ).

L'identification des protéines impliquées dans les voies de signalisation au niveau de l'immunité innée et au niveau des GPCR a permis de distinguer des mécanismes distincts dans les voies de signalisation selon l'agoniste. Entre autre, l'activation des MAPKs p38 et JNK sont dépendante de MALT1 et BCL-10 dans les voies de l'immunité innée tandis que dans les voies du GPCR spécifique au LPA, ces MAPKs ne requiert pas MALT1 ni BCL-10 (Klemm et al., 2007). Les études effectuées dans les voies menant à l'activation du complexe IKK, ont permis l'identification de protéines communes dans ces voies moléculaires. Les caractéristiques des protéines TRAF6 et Ubc13 sont décrites dans les lignes suivantes.

### 1.8.3 Caractéristiques de TRAF6

Les tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) sont des protéines adaptatrices impliquées dans la transmission du signal intracellulaire en servant d'intermédiaire entre le récepteur et les protéines effectrices. Les TRAFs interagissent directement avec les récepteurs contenant des domaines de mort (DD) tandis que l'interaction est indirecte avec les autres récepteurs via le recrutement de protéines dont FADD, TRADD et RIP (Bradley and Pober, 2001). La majorité des actions biologiques des TRAFs sont via l'activation de NF- $\kappa$ B et AP-1 (Chung et al., 2002). Cette famille est composée de sept membres, TRAF1 à TRAF7. Ces protéines ont toutes un domaine C-terminal TRAF composé d'un domaine coiled-coiled suivi d'un domaine conservé impliqué dans l'oligomérisation des TRAF et leur interaction aux protéines effectrices. Puis en N-terminal, ces protéines sont composées de cinq à sept motifs *zinc finger* (ZF). De plus, à l'exception de TRAF1, ces effecteurs ont une activité E3 ligase via leur domaine RING.

Les TRAF sont des protéines cytoplasmiques à l'exception de TRAF4, retrouvé au noyau. TRAF2, TRAF3 et TRAF6 sont exprimés de façon ubiquitaire dans la cellule. De nombreuses recherches identifient TRAF2, TRAF5 et TRAF6 comme des régulateurs positifs des voies menant à l'activation de NF- $\kappa$ B (Hayden and Ghosh, 2008). Parmi ces protéines, TRAF6 est un joueur clé dans la défense contre les pathogènes via l'activation de IKK et des MAPKs JNK et p38 dans les voies de signalisation de IL-1 $\beta$ . En effet, suite à l'activation de souris déficientes en TRAF6 par l'IL-1 $\beta$  et le LPS, une déficience dans l'activation de NF- $\kappa$ B est observée (Skaug et al., 2009). De plus, tel que mentionné précédemment, TRAF6 est impliqué dans la signalisation d'un GPCR, suite à la liaison du LPA menant à l'activation de NF- $\kappa$ B. Ainsi, de nombreuses études restent à être effectuées afin de comprendre le rôle des TRAF dans l'inflammation. Cela en fait un candidat de choix dans l'étude des effets proinflammatoires de l'Ang II.

#### **1.8.4 Caractéristiques d'Ubc13**

Les E2 sont impliqués dans la réaction intermédiaire du processus d'ubiquitination. En effet, cette enzyme est responsable du transfert de l'ubiquitine à la E3 (HECT) ou directement à la protéine cible (RING). La E2, Ubc13, fait partie de nombreuses études depuis les dernières années suite à la découverte de son implication dans plusieurs fonctions cellulaires dont l'inflammation et la réparation de l'ADN. Ubc13 nécessite un cofacteur afin d'initier le processus d'ubiquitination. Ces cofacteurs, nommés Ubc variant, ont une structure semblable à la E2 mais ne contiennent pas de résidus Cys actif. Ainsi, ces cofacteurs ne peuvent pas catalyser la polyubiquitination en K63 eux-mêmes. MMS2 est le 1<sup>er</sup> cofacteur de ce genre à être isolé et contient une homologie de séquence de 90% avec Uev1A, un second cofacteur impliqué dans l'activation d'Ubc13. Ubc13 est la seule E2 spécifique à la formation de chaînes de polyubiquitine en K63 dû à sa conformation adoptée lors de la liaison à son cofacteur permettant l'approche de la K63 de l'ubiquitine au niveau du site actif. Cependant, la réponse cellulaire engendrée diffère selon le complexe Ubc13-cofacteur (MMS2 ou Uev1A) impliqué dans l'élongation de la chaîne d'ubiquitine

augmentant, de ce fait même, la complexité de la compréhension de l'ubiquitination (Andersen et al., 2005). En effet, la liaison de MMS2 à Ubc13 est impliquée dans la réparation de l'ADN tandis que la liaison de cette E2 à Uev1A est impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B. Les recherches se sont penchées sur le rôle d'Ubc13 dans ces fonctions biologiques. Des études démontrent l'implication d'Ubc13 dans le contrôle du cycle cellulaire en agissant sur la protéine suppresseur de tumeur p53 (Topisirovic et al., 2009). Comme mentionné précédemment, Ubc13 est une enzyme impliquée dans de nombreuses voies de signalisation distinctes convergent à l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, dans les voies de l'immunité innée, suite à l'activation du récepteur de l'IL-1 $\beta$ , Ubc13 est responsable de l'ubiquitination en K63 de protéines cibles. Dans cette voie moléculaire, cette modification post-traductionnelle est essentielle à l'activité du complexe. Par contre, les protéines cibles ne sont pas toutes encore reconnues et de nombreuses recherches sont à réaliser. De plus, Ubc13 est responsable de l'ubiquitination en K63 de NEMO dans la voie des TCR et cette modification est essentielle à l'activité maximale du complexe. Ainsi, la protéine Ubc13 est un candidat de choix dans l'étude des voies inflammatoires de NF- $\kappa$ B.

## 1.9 Hypothèses et objectifs

Depuis le début de ma maîtrise dans le laboratoire du Dr. Servant, j'ai travaillé sur différentes hypothèses de recherche, entre autre, la communication entre le récepteur du LPS, TLR4, et le AT1R, puis sur la phosphorylation en tyrosine de p65 dans les CMLV exposées à l'Ang II. Par contre, les résultats obtenus sur ces sujets de recherche réfutaient l'hypothèse de départ et ils ont donc été mis de côté. Ainsi, dans ce mémoire, je discuterai seulement du projet de recherche sur lequel j'ai travaillé au cours de la dernière année.

Tel qu'observé dans les voies moléculaires du système immunitaire ainsi que du LPA, les modifications post-traductionnelles sont impliquées dans la régulation de l'activation protéique notamment via la phosphorylation et l'ubiquitination du complexe IKK. Au niveau du AT1R, les protéines impliquées dans l'activation du complexe IKK dans la voie de l'Ang II sont encore inconnues. Depuis peu, l'implication d'un complexe



protéique, Carma3, BCL-10 et MALT1 et de la polyubiquitination de NEMO dans les voies de signalisation de l'Ang II a été découvert et ouvre la porte à de nombreuses recherches (McAllister-Lucas et al., 2007). Dans la voie du LPA, activant un GPCR, il est important de noter que la polyubiquitination est aussi primordiale que la phosphorylation dans l'activation du complexe IKK. Des recherches sont ainsi entreprises dans le laboratoire à savoir quelles sont les protéines impliquées dans la phosphorylation de IKK $\beta$ , la polyubiquitination de NEMO ainsi que du rôle de l'ubiquitination dans les voies de l'Ang II. Pour ma part, mon projet de recherche consiste à investiguer le rôle de la polyubiquitination en K63 ainsi que les protéines impliquées dans l'ubiquitination de NEMO. Selon la littérature, nous suggérons l'hypothèse de recherche que la polyubiquitination en K63 serait impliquée dans les effets pathophysiologiques de l'Ang II via la signalisation cellulaire du AT1R. Afin de répondre à cette question générale, nous avons émis trois objectifs de recherche (Figure 7, page 57).

### **1.9.1 Objectif 1 – Implication de la protéine Ubc13 dans les voies de l'Ang II**

Le premier objectif est de vérifier l'implication de l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, Ubc13, dans les voies de signalisation cellulaires de l'Ang II dans des CMLV. En effet, tel que discuté précédemment, dans les voies de l'immunité innée, la liaison de l'IL-1 $\beta$  à son récepteur mène à la polyubiquitination en K63 de NEMO, processus réalisé par les protéines Ubc13 et TRAF6. Cette modification est impliquée dans l'activation du complexe IKK menant à l'activation des voies des MAPKs; ERK, JNK et P38 et NF- $\kappa$ B. Puisque l'Ang II initie la polyubiquitination de NEMO, il est possible q'Ubc13 soit impliquée dans les voies de l'AT1R. Afin d'évaluer l'implication d'Ubc13 dans les voies de l'Ang II, la création de populations stables de CMLV dont la diminution de l'expression protéique d'Ubc13 est réalisée par l'utilisation de *short hairpin* ARN (shARN). Par la suite, l'utilisation de la technique d'ARN interférents (siARN) est aussi réalisée dans un même

but. L'activité des voies de signalisation cellulaires ciblées est étudiée par phosphoblot dans ces populations de CMLV.

### **1.9.2 Objectif 2 – Implication de la protéine TRAF6 dans les voies de l'Ang II**

Le second objectif est d'examiner l'implication de TRAF6 dans l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 via la polyubiquitination en K63 de NEMO. En effet, TRAF6 contient une activité E3 ligase et dans plusieurs voies de signalisation, dont l'IL-1 $\beta$  et le LPA, il est démontré que cette activité est impliquée dans son autoubiquitination en K63 mais aussi dans la polyubiquitination en K63 de NEMO. Ainsi, afin de déterminer le rôle éventuel de cette protéine dans les voies de signalisation de l'Ang II, l'étude de l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 en présence ou non de TRAF6 et/ou d'Ang II est entreprise par l'utilisation d'essais rapporteurs luciférase.

### **1.9.3 Objectif 3 – Étude de la polyubiquitination en K63 dans les voies de l'Ang II**

Le dernier objectif est de déterminer "l'ubiquitome", soit l'ensemble des protéines polyubiquitinées en K63 suite à la liaison de l'Ang II au AT1R, processus qui serait impliqué dans les effets proinflammatoires et hypertrophiques du ligand. Afin d'étudier les protéines modifiées par polyubiquitination en K63 suite à un traitement à l'Ang II, la technique utilisée est basée sur la purification par chromatographie d'affinité de lysats protéiques provenant de cellules traitées ou non à l'Ang II surexprimant un plasmide encodant pour une version mutée de l'ubiquitine contenant une étiquette histidine dont seulement la K63 est disponible.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'Ang II permettrait de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques en vue du traitement des maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose. Au cours de la dernière année, je me suis

concentrée sur l'objectif 1, soit l'implication d'Ubc13 dans les voies de signalisation de l'Ang II tout en débutant les objectifs 2 et 3.

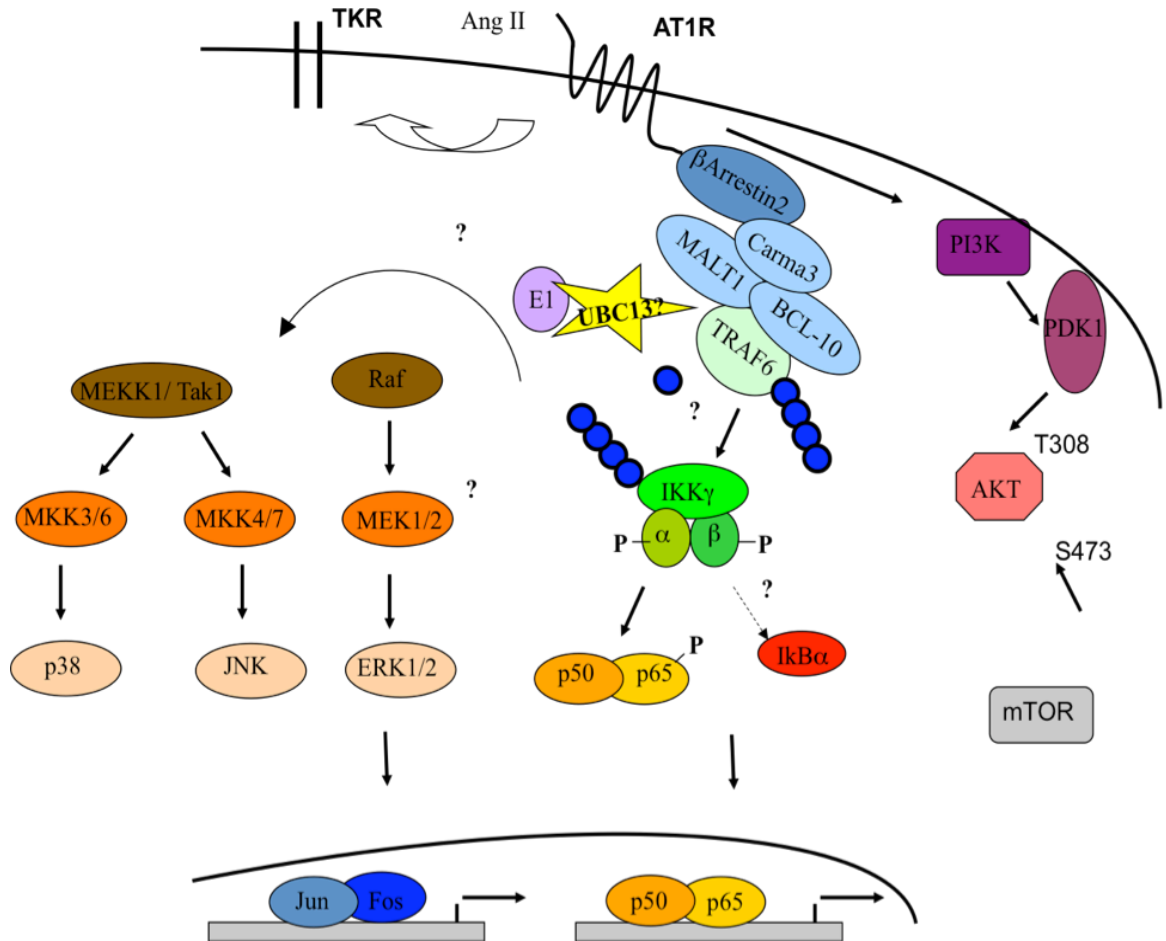


Figure 7 : Schéma représentatif des objectifs de recherche.

La liaison de l'Ang II à son récepteur AT1 mène au recrutement du complexe protéique βarrestine, MALT1, Carma3 et BCL-10. Cela permet le recrutement et l'activation de la protéine ligase TRAF6 (objectif 2). Par son autoubiquitination, TRAF6 et l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, Ubc13 (objectif 1), permettrait la polyubiquitination en K63 de la sous-unité IKKγ du complexe IKK permettant l'activation des cascades de signalisation impliquées dans l'activation du facteur de transcription AP-1 via l'activation des MAPKs ERK1/2, JNK et p38. De plus, le complexe IKK activé permettrait la translocation

du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (p50-p65) au noyau. De plus, la liaison de l'Ang II au AT1R permet l'activation de Akt par deux voies distinctes. Tout d'abord par l'activation de la protéine PI3K qui active PDK1 et phosphoryle Akt en T308 où TRAF6 pourrait avoir un rôle à jouer puis par la voie mTOR en S473. De plus, la polyubiquitination en K63 serait impliquée dans les effets pathophysiologiques de l'Ang II via la signalisation cellulaire du AT1R entre autre via la polyubiquitination en K63 de IKK $\gamma$  mais possiblement via la polyubiquitination d'autres protéines cibles (objectif 3).

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

### **CULTURE CELLULAIRE**

Les CMLV de rat sont obtenues de Darren Edward Richard (L'Hôtel Dieu de Québec, Québec, Qc). Les cellules 293T et 293Ad5 sont achetées de ATCC (Manassas, VA). Les CMLV de rat, les 293T et les 293Ad5 sont maintenues en culture dans du DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium*) *high glucose* contenant 10% de sérum bovin fœtal à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les CMLV de rat exprimant un shARN contre Ubc13 sont maintenues en présence de 1µg/ml de puromycine lors de la culture cellulaire. Les CMLV quiescentes sont arrêtées 24 heures dans un milieu DMEM:HAM's F12 (1:1) supplémenté de 15mM HEPES pH 7,4 et 0,1% sérum bovin albumine ainsi que 5µg/ml de transferrine. Les cellules 293Ad5 sont arrêtées dans un milieu DMEM *high glucose plain* au cours des expériences.

### **AGONISTES, ANTICORPS ET PLASMIDES**

L'Ang II est achetée de Sigma (Saint-Louis, MO). Le TNF $\alpha$  provient de Biosource (Camarillo, CA).

L'anticorps monoclonal anti-Ubc13 (#37-1100) est acheté de Invitrogen. Les anticorps polyclonaux anti-UbcH7 (#3848), anti-phospho-IKK $\alpha$  (S180)/ IKK $\beta$  (S181) (#2681), anti-phospho-Akt (T308) (#9275), anti-phospho-Akt (S473) (9271), anti-phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) (#9251), anti-phospho-p38MAP kinase (T180/Y182) (9211) et anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) (#9101) proviennent de Cell signaling technology (Beverly, MA). L'anticorps polyclonal anti-UbcH5 est acheté de Boston Biochem (Cambridge, MA). L'anticorps anti- $\beta$ actin clone AC-74 (A5316) provient de Sigma. L'anticorps anti-Ubiquitine K63 est acheté de eBioscience (San Diego, CA).

Tous les oligonucléotides (Tableau 1, page 60) sont commandés de Invitrogene (Carlsbad, CA). Le plasmide pBluescript TRAF6 humain est acheté de ATCC (Manassas, VA) et le plasmide pCMV-SPORT6 Ubc13 humain provient de Open biosystems (Lafayette, CO). Le vecteur Flag-TRAF6 est réalisé par l'insertion du gène codant pour TRAF6 dans le vecteur pCMVTAG2B (Invitrogen) par PCR. Les plasmides His Ubiquitine K48 et His Ubiquitine K63 sont réalisés par l'insertion des gènes Ubiquitine K48 et Ubiquitine K63 (Genetech) dans le vecteur pcDNA3.1 HisA (Invitrogene, Carlsbad, CA) qui est préalablement digéré par l'enzyme de restriction NotI. Le plasmide Myc-Ubc13 est réalisé par l'insertion du gène Ubc13 dans le vecteur pCMVTAG3B de Stratagene (LaJolla, CA) par PCR. La validité des vecteurs est vérifiée par séquençage et par la vérification de leur expression suite à leur transfection dans des cellules 293Ad5.

## **MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE**

Les plasmides HA-Ubiquitine K48R, HA-Ubiquitine K63R et Flag-TRAF6C70A sont réalisés par mutagénèse dirigée (QuikChange II site-directed mutagenesis kit; Stratagene, La Jolla, CA). 10ng de plasmide (Flag-TRAF6 ou HA-Ubiquitine) sont mis en présence de la polymérase PFU Ultra HF pour une durée de 16 cycles (30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 6 minutes à 68°C). Par la suite, un traitement à la DPN1 est réalisé. Les produits de la mutagénèse dirigée (1µl) sont transformés dans des bactéries ultracompétentes XL1-blue. Les mutations sont confirmées par séquençage.

Tableau I : Séquence des oligonucléotides utilisés pour la production des plasmides FLAG-TRAF6 et MYC-Ubc13 ainsi que ceux utilisés pour la mutagenèse dirigée de l'ubiquitine.

Nom de l'amorce	Séquence des oligonucléotides
BamHI TRAF6 FW	ACACGGATCCATGAGTCTGCTAAACTGTG
HindIII TRAF6 RV	ACACAAGCTTCTATACCCCTGCATCAGTAC
HindIII Ubc13 FW	AATTAAGCTTATGGCCGGGCTGCCCCGC
XhoI Ubc13 RV	AGTCCTCGAGTTAAATATTATTCATGGCATATAGC
HA-Ubiquitine K48R FW	GACTGATCTTTGCTGGCAGGCAGCTGGAAG
HA-Ubiquitine K48R RV	CGTCCATCTTCCAGCTGCCTGCCAGCAAAG
HA-Ubiquitine K63R FW	CAATATTCAAAGGGAGTCTACTCTTCATCTTGTGTTGAGAC
HA-Ubiquitine K63R RV	GTCTCAACACAAGATGAAGAGTAGACTCCCTTTGAATATTG

Le site des mutations est souligné.

### ARN INTERFÉRENTS (siARN)

Afin de diminuer l'expression des protéines Ubc5, Ubc7 et Ubc13, des *smart pool* contenant quatre différents siARN sont utilisés puis la concentration optimale est déterminée. De plus, un *smart pool* de siARN contrôle est utilisé.

### ARN EN BOUCLES D'ÉPINGLES (shARN)

Afin de construire des populations stables dont l'expression protéique d'Ubc13 est diminuée, six shARN ayant des séquences distinctes sont utilisés. De plus, un shARN contre la protéine GFP est utilisé à des fins de contrôle.

## **TRANSFECTION siARN**

160 000 CMLV sont déposées par puits de 35mm afin d'obtenir une confluence de 30%. Ces cellules sont transfectées par 20nM, 40nM ou 80nM de siARN contrôle ou des *smart pool* contre Ubc5 et/ou Ubc7 et/ou Ubc13 à l'aide de 7,5ul de l'agent transfection Dharmafect #3 de Dharmacon (Lafayette, CO). 48 heures post-transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu d'arrêt des CMLV pendant 24 heures. 72 heures post-transfection, les cellules sont lavées deux fois au PBS froid puis lysées dans 100ul de tampon de lyse RIPA (50mM Tris – HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 40mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1% Triton, 10% Glycérol, 0,1% SDS, 0,5% Sodium Déoxydrolate et des inhibiteurs de protéase ; 1 $\mu$ g/ml pepstatine, 2 $\mu$ g/ml aprotinine, 1 $\mu$ g/ml leupeptine, 0.2mM PMSF, 1mM NaVO<sub>4</sub>) sur glace, pendant 30 minutes puis centrifugées 10 minutes à 13 000rpm à 4°C. Le dosage protéique est effectué par la méthode du BCA puis les extraits sont analysés par immunobuvardage de type Western.

## **PRODUCTION DE POPULATIONS STABLES EXPRIMANT UN shARN CONTRE UBC13**

Des lentivirus sont produits en transfectant le shARN d'intérêt (GFP ou Ubc13) contenant un gène de résistance à la puromycine ainsi que les trois vecteurs lentiviraux plp1 (codant pour la protéine structurale gag et la polymérase du HIV-1 pol, plp2 (codant pour la protéine reverse Rev du HIV-1 permettant l'expression de gag et pol) et pLP/VSVG (codant pour la glycoprotéine de l'enveloppe VSV-G) dans des cellules d'emballage, des 293T. Trois jours plus tard, le surnageant est prélevé. Ensuite, des CMLV de rat de type Wistar sont infectés par un dixième du surnageant récolté contenant les lentivirus exprimant un shARN contre Ubc13 ou contre GFP. Parallèlement, l'infection de CMLV de rat de type Wistar exprimant la protéine GFP par le shGFP est effectuée afin de vérifier l'efficacité de transfection de ce shARN par microscopie. 72 heures post-infection, les cellules sont mises en sélection en présence de 2 $\mu$ g/ml de puromycine (Figure 8, page 63) puis, après une



semaine en culture, maintenues en sélection à 1 $\mu$ g/ml. Ces cellules sont lysées dans un tampon RIPA puis l'analyse de la diminution de l'expression de la protéine est réalisée par immunobuvardage par l'utilisation d'un anticorps contre Ubc13.

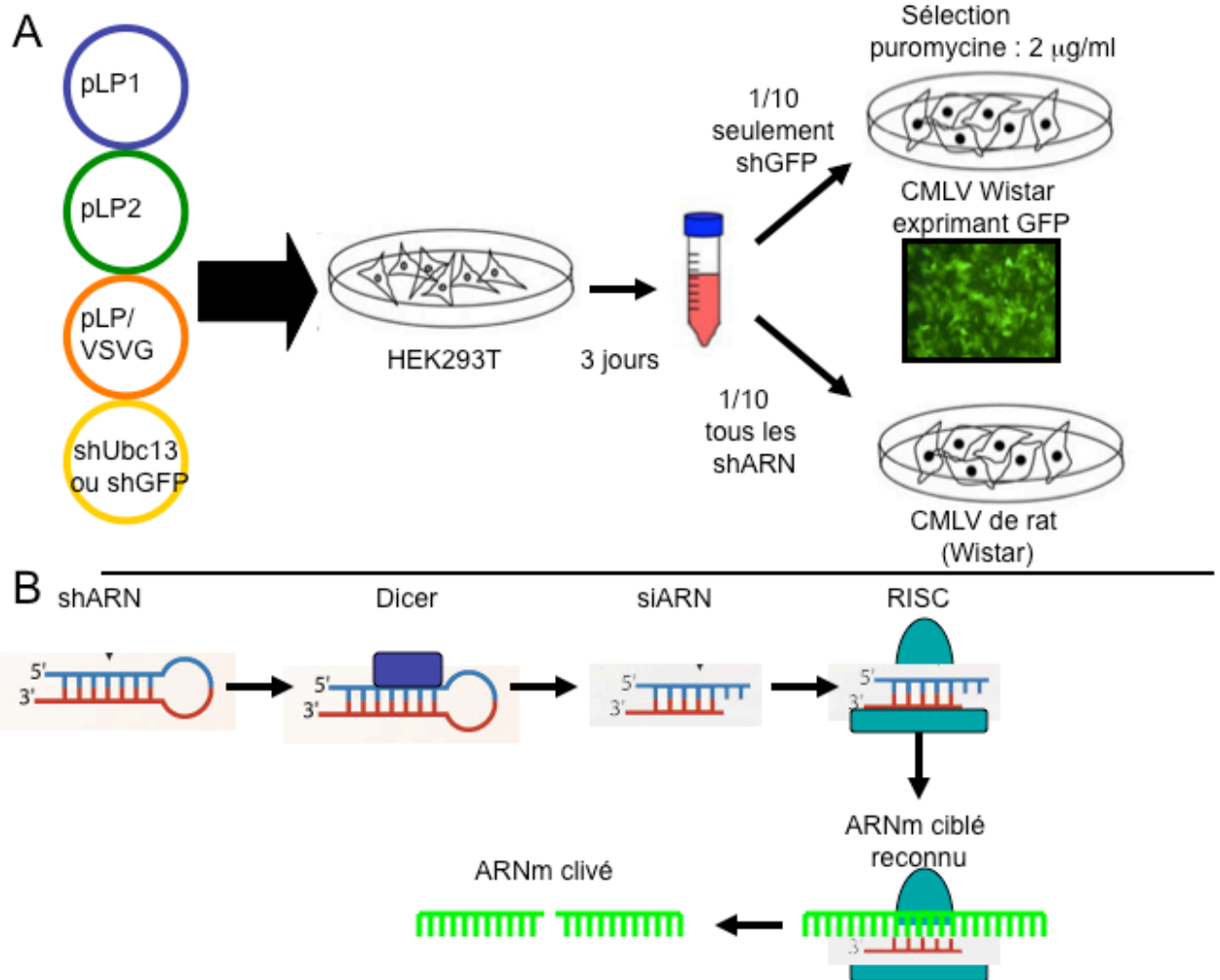


Figure 8 : Représentation schématique du protocole permettant la production de population stables de CMLV shUbc13 par infection lentivirale (A) tel que décrit ci-haut et processus cellulaire menant à la dégradation d'un ARN messager spécifique par shARN (B).

(B) Suite à l'insertion du shARN dans le génome de la cellule, le shARN est exprimé au sein de celle-ci puis exportée vers le cytoplasme. Le shARN, un ARN de 21 à 23 nucléotides contenant une structure en boucle d'épingle, est reconnu par un complexe protéique, Dicer qui clive la boucle laissant un fragment d'ARN nommé siARN. Ce siARN est reconnu par un second complexe protéique, RNA-induced silencing complex (RISC). La protéine catalytique du complexe protéique RISC, argonaute, reconnaît la séquence complémentaire du siARN dans l'ARNm et clive l'ARNm d'intérêt via son activité endonucléase.

### **IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN**

Tous les extraits cellulaires sont quantifiés par la méthode de BCA. Par la suite, 40 à 60ug de protéines sont séparés sur gel de polyacrylamide 7,5, 10 ou 15% avec SDS. Suite à la migration, ces protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant deux heures à 4°C dans un tampon de transfert avec méthanol (14,4g/L de glycine, 3g/L de TRIS et 20% méthanol). Ensuite, la membrane est bloquée, pendant une heure, dans une solution de TBS 0,1% Tween 20 contenant 5% de lait puis incubée dans un anticorps primaire selon les spécifications de chacun. La membrane est ensuite lavée 5 fois 5 minutes dans du TBS 1% Tween 20 puis incubée deux heures dans l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La membrane est lavée, encore une fois, 5 fois 5 minutes dans du TBS 1% Tween 20 puis la présence des protéines d'intérêt est révélée par l'utilisation d'ECL (*enhanced chemiluminescence*).

### **ESSAIS LUCIFÉRASE**

Des cellules 293Ad5, soit 100 000 par puits dans une plaque 24 puits, sont transfectées au phosphate de calcium par 200ng de rapporteur NF-κB (pLUC-PRDII), 100ng de HA-AT1, 10ng de pRL-TK (contrôle interne *renilla* luciférase) et une concentration croissante de Flag-TRAF6 complétée par le vecteur pCMVTAG3B, afin

d'avoir la même concentration d'ADN. Après 16 heures, le changement de milieu par un milieu frais sans sérum est effectué. 24 heures plus tard, les cellules sont stimulées pendant 16 heures par 1 $\mu$ M d'Ang II puis elles sont rincées deux fois au PBS froid et lysées dans un tampon de lyse passif de chez Promega (Madison, WI). 10 $\mu$ l d'extrait est utilisé pour l'analyse par le *dual-luciferase activity kit* selon les instructions de la compagnie. Les valeurs obtenues pour la *firefly* luciférase sont normalisées par celles obtenues pour la *renilla* luciférase afin de contrôler l'efficacité de transfection.

### **ESSAIS KINASE ERK *IN VITRO***

Des CMLV quiescentes, exprimant un shRNA contre GFP ou Ubc13, sont stimulées à divers temps par 100 nM d'Ang II ou 20% sérum bovin fœtal. Les cellules sont lysées puis 250 $\mu$ g de chacun des extraits cellulaires sont soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-ERK (SM1.61) préalablement couplé à des billes de sépharose A. Le complexe est ensuite incubé 10 minutes à 30°C en présence de 50 $\mu$ M ATP, 5 $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP et 10 $\mu$ g du substrat, *myelin basic protein* (MBP). Les échantillons sont analysés sur un gel SDS-PAGE 12% puis coloré au bleu de Coomassie puis séché et exposé dans un dispositif adéquat (TYPHOON scanner 9410) afin de quantifier le MBP radioactif. De plus, 60 $\mu$ g de l'extrait protéique précédent est séparés sur gel SDS-PAGE 10% afin de vérifier la l'état de phosphorylation de ERK par un anticorps spécifique.

### **ESSAIS SYNTHÈSE PROTÉIQUE**

Des CMLV quiescentes sont mises en présence de 1 $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-Leucine et elles sont stimulées 24 heures à différentes concentrations d'Ang II (10<sup>-4</sup>M à 10<sup>-11</sup>M) ou par 20% FBS. Une solution de 5% d'acide trichloracétique (TCA) est ajoutée aux cellules puis elles sont recueillies dans du NaOH 0,1N. Par la suite, l'incorporation de leucine tritié est obtenu par un  $\beta$ compteur en coup par minutes (c.p.m.).

## **CARACTÉRISATION D'UN ANTICORPS ANTI-UBIQUITINE K63**

La vérification de la spécificité de l'anticorps anti-ubiquitine K63 est effectuée par la transfection de 2 $\mu$ g des vecteurs pcDNA3.1, HA-ubiquitine, HA-ubiquitine K48R ou HA-ubiquitine K63R dans des 293Ad5-Qbi. Par la suite, ces lysats protéiques sont séparés sur gel SDS 7,5%. Celui-ci est transféré dans un tampon sans méthanol (14,4g/L de glycine et 3g/L de TRIS) sur une membrane de PVDF préalablement hydratée dans du méthanol. Ensuite, ces protéines sont fixées dans une solution de fixation (7% acide acétique, 40% méthanol et 3% glycérol) pendant 30 minutes. Ensuite, celle-ci est lavée deux fois 10 minutes dans du TBS-T puis dénaturée 30 minutes à 4°C dans un tampon de dénaturation (20mM Tris-HCl pH7,4, 6M guanidine-HCl, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol et 1mM PMSF). La membrane est lavée 5 fois 5 minutes dans du PBS froid à 4°C puis les procédures habituelles (voir section immunobuvardage de type western) sont effectuées pour les anticorps anti-ubiquitine P4D1 et anti-ubiquitine K63.

## **PURIFICATION DES PROTÉINES POLYUBIQUITINÉES EN K63 SUR COLONNE DE NICKEL**

Afin d'étudier les protéines ubiquitinées en K63 suite à un traitement à l'Ang II, des cellules 293Ad5 sont transfectées, selon la méthode du phosphate de calcium, par 4 $\mu$ g de vecteurs sont His ubiquitine K63, His pcDNA3.1, HA-AT1R, pcDNA3.1 et/ou Flag NEMO dans un 100mm. Les cellules sont stimulées à différents temps par 100nM d'Ang II puis rincées deux fois au PBS froid. Par la suite, les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse dénaturant (6M Guanidine-HCl, 0,5% Triton, 10mM Imidazole, 20mM Tris-HCl pH 8.0 et un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de déubiquitination; 1 $\mu$ g/ml pepstatine, 2 $\mu$ g/ml aprotinine, 1 $\mu$ g/ml leupeptine, 0.2mM PMSF, 1mM NaVO<sub>4</sub>, 2mM N-Ethylmaleimide (NEM)). Afin de réduire la viscosité des lysats protéiques, un sonicateur est utilisé à une amplitude de 20%, trois fois 10 secondes, par lysat cellulaire. La purification des protéines est effectuée par une incubation de 3 heures à température pièce

de 100ul de billes de Nickel en présence de 1mg de protéine. Les billes sont lavées trois fois dans le tampon de lyse dénaturant, deux fois dans une solution 1 :4 (tampon de lyse dénaturant : 25mM Tris-HCl pH 6,8 et 20nM Imidazole) et deux fois dans une solution 25mM Tris-HCl pH6.8 et 20mM Imidazole. Les protéines sont éluées par 50ul de SB2X contenant 20mM Imidazole puis séparées sur gel SDS-PAGE 7,5% et transférées sur membrane de PVDF.

### **ANALYSE STATISTIQUE**

Les analyses statistiques sont réalisées par l'utilisation du logiciel GraphPad Prism version 5.0 pour Mac (GraphPad Software, San Diego, Californie, USA). La comparaison des groupes est effectuée par un test *one-way* ANOVA suivi d'un test Bonferroni. Les données statistiques significatives sont acceptées à une valeur de P sous 0,05. N = le nombre d'expériences indépendantes effectuées.

## **Chapitre III : Résultats**

### **3.1 : Objectif 1 – Implication de la protéine Ubc13 dans les voies de l'Ang II**

#### **Détermination des temps optimaux menant à l'activation des MAPKs, de IKK et de Akt dans des CMLV exposées à l'Ang II**

Au départ, une cinétique d'activation dans des CMLV primaires de rat, à une concentration unique d'Ang II, est effectuée afin de vérifier les temps optimaux à utiliser afin d'entreprendre l'étude de l'activation des voies de signalisation d'intérêts par cet agoniste. L'Ang II induit la phosphorylation des protéines Akt, IKK et des MAPKs ERK, JNK et p38. La phosphorylation maximale de ces protéines est obtenue majoritairement après 5 minutes de traitement à l'Ang II et se poursuit jusqu'à 10 minutes pour ensuite diminuer à des temps de stimulation plus long. Ainsi, des temps de 5 et 10 minutes d'Ang II dans les CMLV de rat sont l'idéals pour l'étude de ces voies moléculaires (Figure 9, page 69).

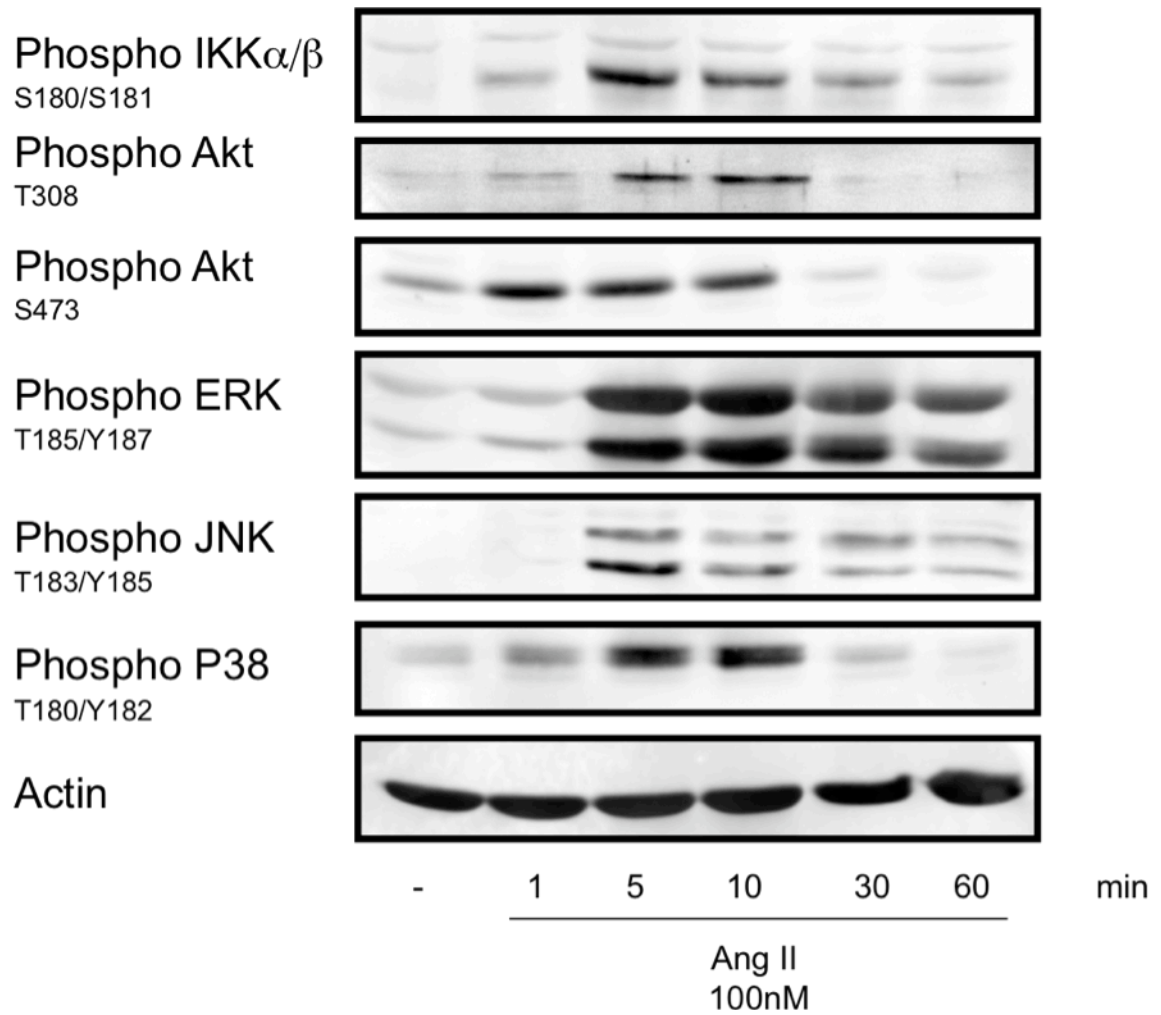


Figure 9 : L'Ang II induit la phosphorylation de IKK, de Akt et des MAPKs ERK1/2, JNK et p38 dans des CMLV de rat.

Des CMLV quiescentes sont exposées à 100nM d'Ang II à différents temps puis les lysats cellulaires sont séparés sur un gel SDS 10% et analysés par phosphoblot. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

### **Étude d'Ubc13 dans des populations de CMLV exprimant un shARN contre cette protéine**

Ensuite, afin d'étudier le rôle d'Ubc13 dans un contexte cardiovasculaire, la première approche utilisée consiste à infecter des CMLV par des lentivirus exprimant un ARN en boucle d'épingle (6 shRNA distingués par ces chiffres ; #10-16-34-35-38-50) distincts contre Ubc13. Par la suite, ces cellules sont mises en sélection à la puromycine afin de créer des populations stables dont l'expression d'Ubc13 est diminuée. De plus, afin de s'assurer que l'effet observé lors des expérimentations est causé par la diminution de l'expression de la protéine Ubc13 et non par l'introduction d'un shARN, des cellules contrôles sont produites par l'infection de CMLV par des lentivirus exprimant un sh contre la protéine GFP. L'infection de CMLV exprimant la protéine GFP par le shGFP est effectuée en parallèle et visualisée au microscope afin de s'assurer de l'efficacité de l'infection. La diminution de l'expression de la protéine Ubc13 dans les populations de CMLV shUbc13 varie selon la séquence du shARN utilisée. L'expression d'Ubc13 dans les populations #10, 16 et 34 est comparable aux cellules contrôles shGFP contrairement aux populations cellulaires #35, 38 et 50 qui expriment, respectivement, une diminution d'environ 70%, 75% et 90% de l'expression d'Ubc13. Par phosphoblot, la diminution de l'expression protéique d'Ubc13 ne semble pas impliquée dans la phosphorylation des MAPKs et de IKK dans les populations #38 et 50 néanmoins une diminution de la phosphorylation de ces voies est rencontrée dans la population #35 (Figure 10, page 71). Il n'y a pas de corrélation entre l'expression d'Ubc13 et les effets observés. Le phénotype cellulaire est identique d'une population cellulaire à l'autre à l'exception de la population shUbc13 #35. Les cellules de la population shUbc13 #35 ont un gros cytoplasme comparativement au noyau ayant pour conséquence une confluence distincte pour un même compte cellulaire. De plus, la division cellulaire semble plus lente dans les populations shUbc13 #35, #38 et #50 comparativement aux autres populations cellulaires. Ainsi, en plus d'observer une diminution de l'expression protéique d'Ubc13 distincte, le phénotype des cellules diffère selon la population.



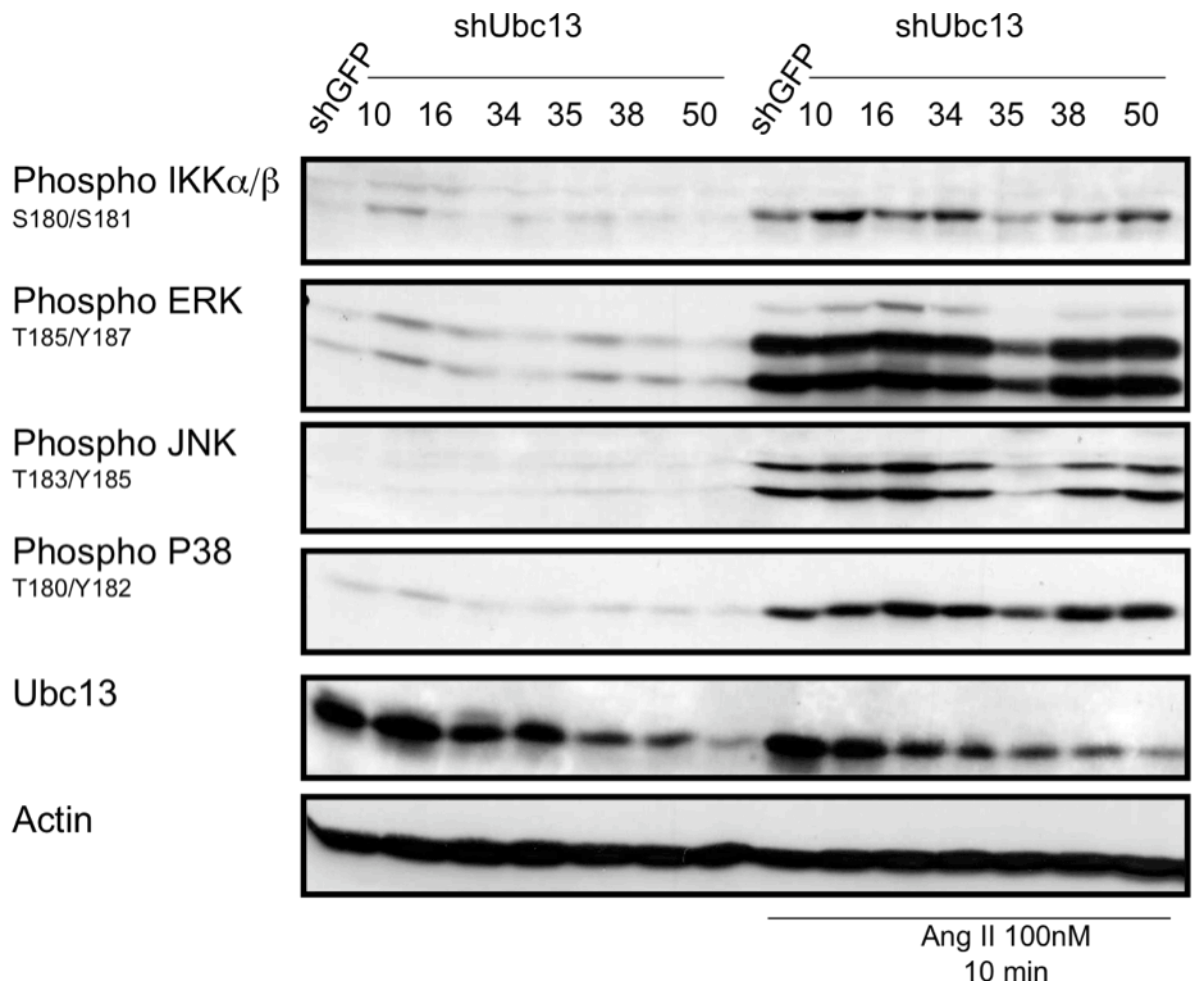


Figure 10 : **La diminution de l'expression protéique d'Ubc13 n'a pas d'effet sur l'activation des voies MAPKs par phosphoblot dans des CMLV exposées à l'Ang II, à l'exception de la population 35.**

Des population de CMLV exprimant un shARN contre Ubc13 ou GFP sont conservées en sélection à la puromycine (1 $\mu$ g/ml). Ces cellules quiescentes sont stimulées par 100nM d'Ang II pendant 10 minutes puis les lysats cellulaires sont séparés sur gel SDS 10% et 15% et analysés par phosphoblot. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

Suite à ce résultat, deux approches sont réalisées. Tout d'abord des essais de complémentation de la population shUbc13 #35 sont effectués mais sans succès (résultats non présentés). De plus, diverses études sont entreprises en même temps afin d'étudier la population shUbc13 #35 (approche 1). D'autre part, une seconde technique est exécutée, soit l'approche siARN afin d'étudier Ubc13 (approche 2).

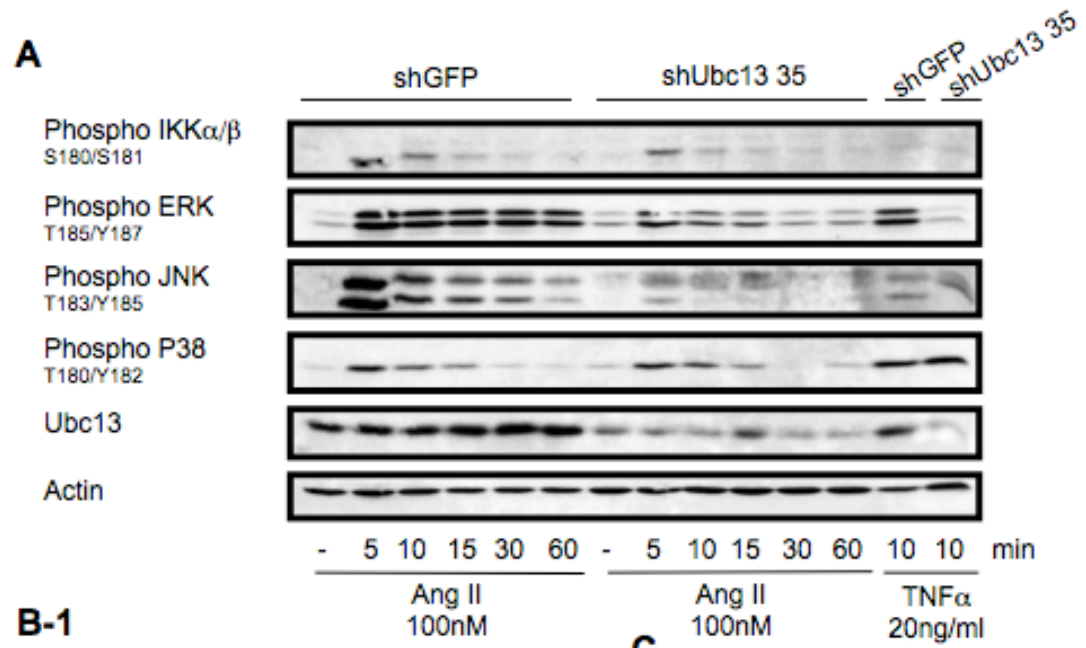
### **Approche 1 : étude de la population de CMLV shUbc13 #35**

La population de CMLV shUbc13 #35 exprime une réduction de 70% de l'expression protéique d'Ubc13 et la phosphorylation des voies MAPKs ERK, JNK et p38 et du complexe IKK suite à un traitement de 5 minutes à l'Ang II est diminuée comparativement aux cellules contrôles (Figure 10, page 71). L'étude de la population shUbc13 #35 est donc débutée par la vérification de la phosphorylation de Akt, de IKK et des MAPKs suite à une cinétique d'activation à l'Ang II parallèlement aux CMLV contrôles. Suite à un traitement à l'Ang II, une diminution de la phosphorylation de IKK et des MAPKs ERK1/2 et JNK est observée par phosphoblot dans la population cellulaire shUbc13 #35 comparativement aux cellules contrôles et ce dès 5 minutes de stimulation (Figure 11B-1, page 74). Aucun changement n'est observé au niveau de la phosphorylation de p38 selon les populations cellulaires suite à une stimulation à l'Ang II. De plus, le contrôle TNF $\alpha$  semble avoir la même tendance, soit une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 et JNK mais pas de p38 lorsqu'on compare les cellules shGFP et shUbc13 #35 (Figure 11A, page 74). L'utilisation du TNF $\alpha$  comme contrôle négatif, est effectué puisque selon la littérature, l'activation des MAPKs et de IKK dans cette voie moléculaire n'implique pas les protéines Ubc13 ni TRAF6 (Xu et al., 2009a). Selon ce résultat, Ubc13 semble impliqué dans la phosphorylation de ERK1/2, JNK et IKK mais n'a aucune effet sur la phosphorylation de p38 dans les voies de l'Ang II.

Ensuite, afin de vérifier que la diminution de la phosphorylation implique une diminution de l'activité de la protéine, un essai kinase *in vitro* ERK dans les populations

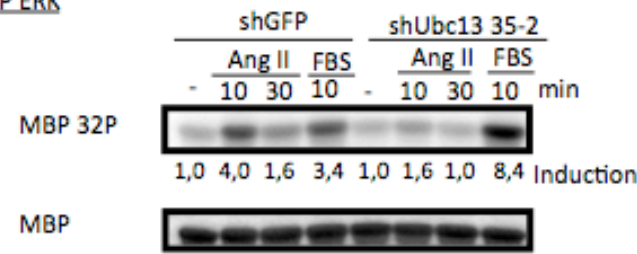
cellulaires shGFP et shUbc13 #35 stimulées à l'Ang II est effectué. L'activité de la kinase ERK, suite à un traitement de 10 minutes à l'Ang II, passe d'une induction de 4,0 dans la population shGFP à 1,6 dans la population shUbc13 #35 (Figure 11B-1, page 74). Cet effet est aussi observé à un temps de cinétique plus long passant de 1,6 à 1,0 après 30 minutes de traitement. L'activation de ERK suite à l'exposition au FBS est plus intense dans les cellules shUbc13 #35 (induction de 8,4) que pour les cellules contrôles, shGFP (induction de 3,4). Le FBS est utilisé dans cette expérience à des fins de contrôle positif. En effet, le FBS active fortement les voies MAPKs (Thrane et al., 2001). L'analyse de ces mêmes extraits protéiques sur gel (Figure 11B-2, page 74) révèle une diminution de la phosphorylation de ERK dans la population shUbc13 #35 suite à un traitement à l'Ang II tel qu'obtenu à la figure 10 page 71 . Ce résultat révèle que la diminution de l'activité phosphotransférase de ERK corrèle avec la diminution de sa phosphorylation et ce plus fortement après 10 minutes d'Ang II.

D'autre part, dans les populations cellulaires shUbc13 obtenues précédemment (Figure 10, page 70), en plus d'observer une diminution de l'expression protéique d'Ubc13 distincte, le phénotype est différent pour la population #35. Afin de quantifier les effets hypertrophiques de l'Ang II, un essai de synthèse protéique est effectué dans ces populations cellulaires pour vérifier l'influence de la diminution de ERK sur le taux d'expression protéique. La synthèse protéique est augmentée en fonction de la dose d'Ang II dans les population shGFP passant de 18611 c.p.m. au niveau basal à 52761 c.p.m. à 10 $\mu$ M d'Ang II (induction de 2,8 fois). Dans la population shUbc13 #35, un niveau basal d'incorporation de 10860 c.p.m. et une incorporation de 19442 c.p.m. à 10 $\mu$ M d'Ang II est obtenu (induction de 1,8 fois). Ainsi, une diminution de l'incorporation de leucine tritiée est observée dans les cellules shUbc13 #35 comparativement aux conditions shGFP. Cette étude démontre que la déficience en Ubc13 influence la synthèse protéique en réponse à l'Ang II dans les CMLV shUbc13 #35 comparativement aux cellules shGFP (Figure 11C, page 74).



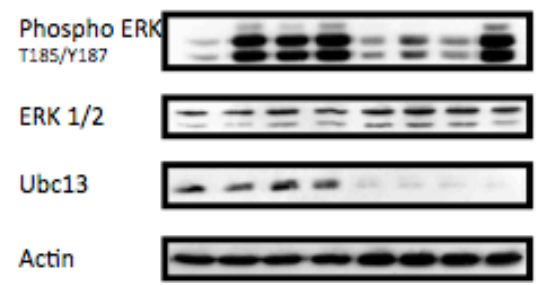
**B-1**

IP: ERK

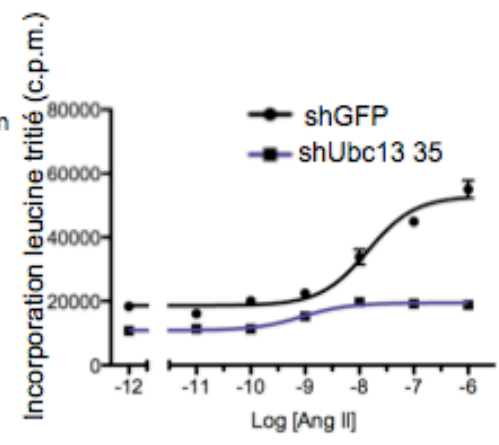


**B-2**

Input



**C**



**Figure 11 : La population de CMLV shUbc13 #35 démontre l'implication d'Ubc13 dans l'activation des MAPKs ERK1/2 et JNK et dans la synthèse protéique.**

(A) Les populations de CMLV exprimant un shARN contre GFP ou Ubc13 #35 quiescentes sont exposées à 100nM d'Ang II pendant 5 minutes puis les lysats cellulaires sont séparés sur gel SDS 10% et 15% et analysés par phosphoblot. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes. (B) Des CMLV shGFP ou shUbc13 #35 quiescentes sont stimulées à divers temps par 100nM d'Ang II ou 20% *fetal bovine serum* (FBS). Les cellules sont lysées puis les extraits cellulaires sont soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-ERK. Le complexe est ensuite incubé en présence d'ATP radiomarqué et du substrat, *myelin basic protein* (MBP) puis le MBP radioactif est quantifié (B-1). De plus, une partie des extraits protéiques précédents sont séparés sur gel SDS-PAGE 15% (B-2). (C) Les CMLV shGFP et shUbc13 #35 quiescentes sont stimulés à diverses concentrations d'Ang II en présence de leucine tritié pendant 24 heures puis l'incorporation de cet acide aminé est mesuré en c.p.m.. Ce résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

**Approche 2 : étude d'Ubc13 par siARN**

Afin d'étudier le rôle d'Ubc13, selon une autre approche, un *smart pool* de siARN contre Ubc13, contenant quatre séquences distinctes spécifiques à la protéine d'intérêt, est utilisé dans les CMLV. Préalablement, des essais sont réalisés pour obtenir la concentration optimale de siARN à utiliser afin d'observer une diminution de l'expression protéique considérable, soit d'au moins 70%. Une concentration de 20nM permet la diminution d'Ubc13 d'environ 80% comparativement aux cellules traitées avec un siARN contrôle (Figure 12A, page 76). Les résultats sont similaires à des concentrations plus élevées (40nM et 80nM). Ainsi, la concentration optimale pour l'utilisation du *smart pool* de siARN spécifique à Ubc13 est de 20nM. Ensuite, une cinétique d'activation à l'Ang II dans les CMLV en présence du *smart pool* de siARN contrôle ou contre Ubc13 est effectuée. La phosphorylation du complexe IKK et des MAPKs ERK1/2, JNK et p38, suite à un traitement à l'Ang II sont identiques dans les populations contrôles et celles dont

l'expression d'Ubc13 est diminuée. De plus, le contrôle négatif au TNF $\alpha$  répond de la même façon. Ainsi, ce résultat suggère que la diminution de l'expression d'Ubc13 n'influence pas la phosphorylation des MAPKs ni celle du complexe IKK (Figure 12B, page 76).

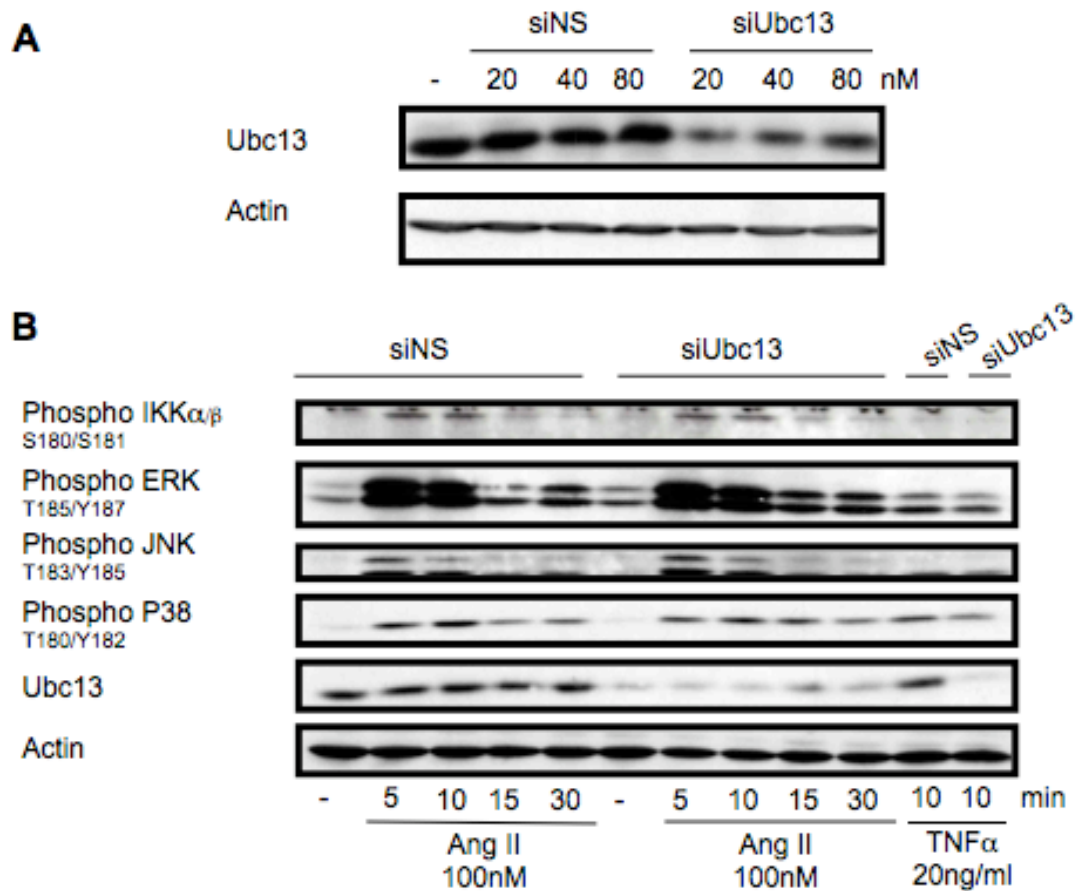


Figure 12 : Ubc13 n'est pas impliqué dans la phosphorylation des MAPKs et du complexe IKK dans des CMLV exposées à l'Ang II par l'utilisation de siARN.

(A) Des CMLV sont transfectées par diverses concentrations de siARN (20, 40, 80nM) contrôle ou contre Ubc13 pendant 48 heures puis l'analyse de la diminution de l'expression d'Ubc13 est révélé par un anticorps anti-Ubc13 (1 $\mu$ g/ml). (B) Des CMLV sont transfectées

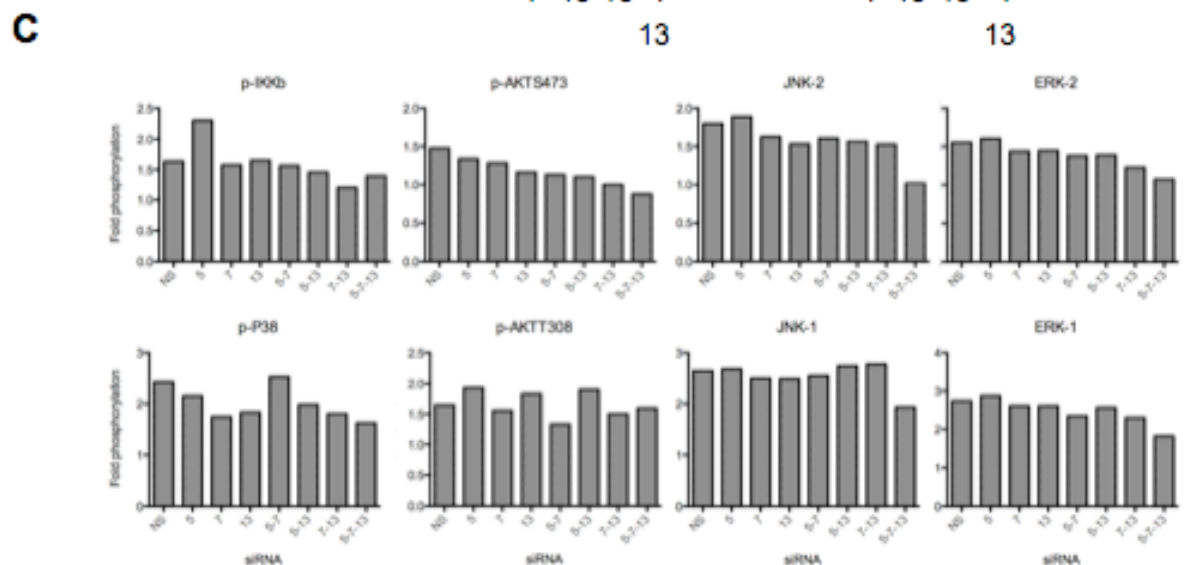
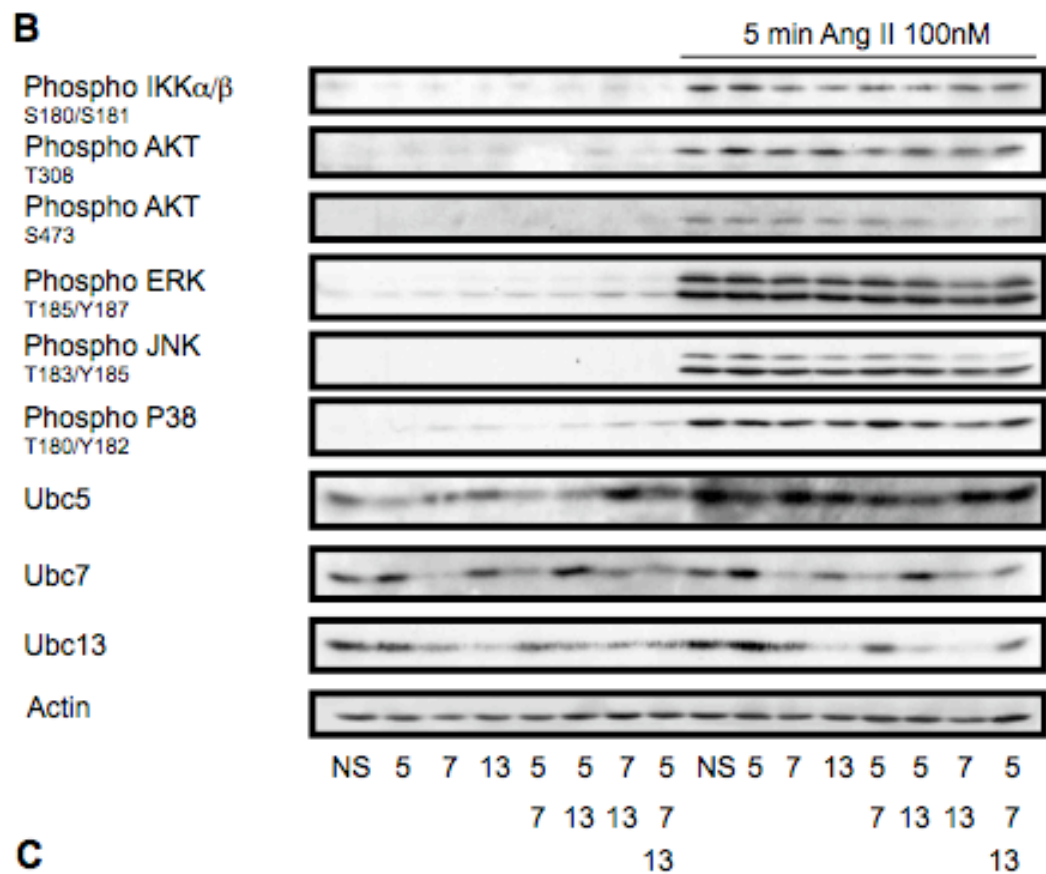
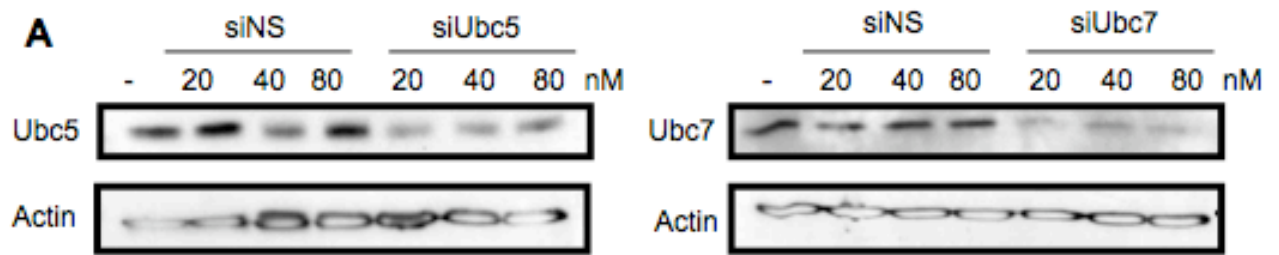
par 20nM de siARN puis arrêtées 24 heures avant d'être stimulées à divers temps en présence de 100nM d'Ang II ou de 20ng/ml de TNF $\alpha$ . L'activation des MAPKs et de IKK est révélée par des anticorps phospho-spécifique. Où siNS = siARN *Non-silencing*. Ce résultat est représentatif de 2 expériences indépendantes.

### **Étude des enzymes de conjugaison Ubc5c, Ubc7 et Ubc13 par siARN**

La diminution de l'expression d'une protéine dans la cellule peut mener à l'activation d'autres voies de signalisation compensatoires. Selon la littérature, la diminution d'une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine dans la cellule, comme Ubc13, peut être compensé par une autre enzyme de conjugaison. Les E2 Ubc5c et Ubc7 sont des candidats de choix. En effet, Ubc7 peut faciliter la polyubiquitination de TRAF6 en K63 et la E2 Ubc5, plus précisément l'isoforme Ubc5c, est connue pour son rôle dans l'activation du complexe IKK, en présence de TRAF6, par la formation de chaîne de polyubiquitine (Xia et al., 2009; Yamamoto et al., 2006a). Ainsi, l'étude de l'implication possible de ces protéines dans les voies de l'Ang II est entreprise par l'utilisation de siARN contre ces E2. Au départ, des essais sont réalisés afin de vérifier la concentration optimale du *smart pool* de siARN à utiliser pour Ubc5c et Ubc7 dans les CMLV tel que réalisé précédemment pour Ubc13. La transfection des CMLV par une concentration de 20nM de *smart pool* spécifique à Ubc5c ou à Ubc7 permet une diminution de 90% de leur expression protéique. Ce même résultat est obtenu à des concentration plus élevées, soit 40nM ou 80nM de siARN. Ainsi, la concentration optimale est de 20nM pour les deux protéines (Figure 13A, page 79) tel qu'obtenu pour Ubc13. Ensuite, les CMLV sont mises en présence des siARN contre les E2 seules et par diverses combinaisons des siARN contre ces E2 puis traitées pendant 5 minutes à l'Ang II afin d'étudier l'état de la phosphorylation de IKK, de Akt et des MAPKs. Tout d'abord, la diminution de l'expression d'Ubc5c seul ne change pas l'état de phosphorylation des MAPKs, de IKK ni de Akt (Figure 13B, page 79). Par contre, lors d'une diminution de l'expression d'Ubc7 ou d'Ubc13, une diminution de la phosphorylation de IKK est observée. La combinaison des siARN contre Ubc5c et Ubc7

mène à une diminution de la phosphorylation de Akt en T308 et en S473 cependant la combinaison des siARN spécifiques à Ubc7 et Ubc13 ou à Ubc5c et Ubc13 diminue la phosphorylation de Akt en S473. En plus, lors de la combinaison des siARN spécifiques aux E2, Ubc7 et Ubc13, une légère diminution de la phosphorylation des MAPKs, ERK1/2, JNK et p38 sont observés. Aussi, lors de la combinaison des siARN contre les E2, la diminution de l'expression Ubc5c, semble augmenter l'expression d'une autre E2, soit Ubc7 (Figure 13B, page 79). La quantification de l'intensité des bandes révèle que la combinaison des siARN contre les E2 Ubc5-Ubc13, Ubc7-Ubc13 et majoritairement la combinaison Ubc5-Ubc7-Ubc13 a un effet plus marqué sur la diminution de la phosphorylation des protéines traitées à l'Ang II (Figure 13C, page 79). Ces résultats semblent suggérer un mécanisme de compensation cellulaire entre les E2 lors de la diminution de leur expression. Les enzymes Ubc7 et Ubc13 semblent impliqués dans la phosphorylation des voies moléculaires menant à la phosphorylation des MAPKs, du complexe IKK et de Akt.





**Figure 13 : Ubc7 et Ubc13 ensemble sont impliquées dans la phosphorylation des MAPKs, de Akt et du complexe IKK dans des CMLV exposées à l'Ang II, par l'utilisation de siARN.**

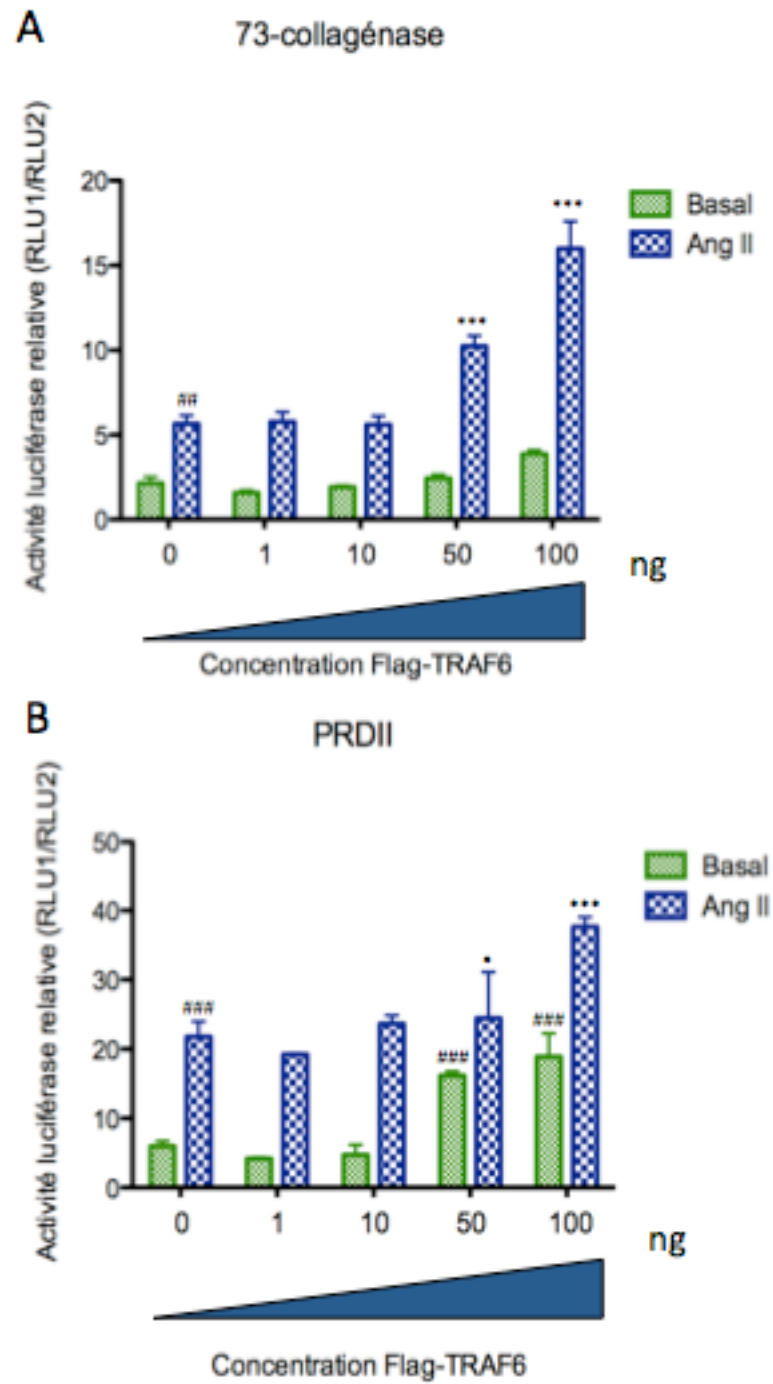
(A) Des CMLV sont transfectées par diverses concentrations de siARN (20, 40, 80nM) contrôle ou contre Ubc5c ou Ubc7 pendant 48 heures puis l'analyse de la diminution de l'expression protéique est révélée par un anticorps anti-Ubc5 (1/1000) ou anti-Ubc7 (1/1000). (B) Des CMLV sont transfectées par 20nM de siARN puis arrêtées 24 heures avant d'être stimulées à divers temps en présence de 100nM d'Ang II ou de 20ng/ml de TNF $\alpha$ . L'activation des MAPKs et de IKK est révélée par des anticorps phospho-spécifiques. Où NS = siARN *Non-silencing*. 5=siARN Ubc5c, 7=siARN Ubc7 et 13=siARN Ubc13 (C) Quantification de l'induction phospho-spécifique suite à un traitement à l'Ang II comparativement au basal des échantillons en B.

## **3.2 Objectif 2 : Implication de la protéine TRAF6 dans les voies de l'Ang II**

**Étude de l'implication de TRAF6 dans l'activation de NF- $\kappa$ B et AP-1 suite à un traitement à l'Ang II**

L'implication des TRAF dans l'activation de NF- $\kappa$ B en fait un bon candidat pour l'étude des voies de l'Ang II. En effet, l'implication de TRAF6 et du complexe Carma3, BCL-10, MALT1 dans l'activation de NF- $\kappa$ B en présence de LPA ne fait que susciter cette hypothèse puisque l'implication du complexe Carma3, BCL-10, MALT1 est connue dans les voies de l'Ang II (McAllister-Lucas et al., 2007). Ainsi, afin d'étudier l'implication de TRAF6 dans la signalisation cellulaire menant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 dans les voies moléculaires de l'Ang II, des essais rapporteurs luciférase sont utilisés. Deux rapporteurs, PRDII (induit par NF- $\kappa$ B) et 73-collagénase (induit par AP-1) sont choisis. Ces vecteurs possèdent les séquences promotrices de facteurs de

transcription précis, soit respectivement NF- $\kappa$ B et AP-1 et sont suivis d'un gène codant pour la protéine chimioluminescente *firefly* luciférase permettant la quantification de l'activité transcriptionnelle. De plus, un contrôle interne encodant pour le gène rapporteur de la *renilla* luciférase est utilisé afin de normaliser les résultats entre chaque puits dû à la variabilité de l'efficacité de transfection. La transfection des vecteurs PRDII ou 73-collagénase est effectuée dans les cellules 293Ad5 en présence du AT1R et d'une dose croissante de TRAF6. Ces cellules sont utilisées dû à leur forte réponse à l'Ang II et à leur efficacité de transfection. L'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B par l'Ang II est induite de façon significative, soit respectivement de 2,7 fois pour AP-1 (Figure 14A, page 82) et de 3,6 fois pour NF- $\kappa$ B en comparaison avec le basal. L'Ang II induit l'activation de PRDII de 3,7 fois en B (Figure 14B, page 82). La surexpression de TRAF6 induit l'activation d'AP-1 et ce de façon dose dépendante passant à une induction maximale de 4,1 fois lors de l'expression de 100ng de TRAF6 (Figure 14A, page 82). La surexpression de TRAF6 à elle seule selon des doses de 50 à 100ng augmente l'activité transcriptionnelle basale de NF- $\kappa$ B de 2,7 et 3,2 fois (Figure 14B, page 82). Lors du traitement de ces cellules, exprimant le rapporteur PRDII et la protéine TRAF6, par l'Ang II, un effet additif est observé. Ainsi, TRAF6 semble impliqué dans l'activation de AP-1 mais non dans l'activation de NF- $\kappa$ B dans les voies moléculaires de l'Ang II.



**Figure 14 : Induction de gènes rapporteurs luciférase sous le contrôle des promoteurs 73-collagénase (A) ou PRDII (B) à des doses croissantes de TRAF6 dans des 293Ad5 exposées à l'Ang II.**

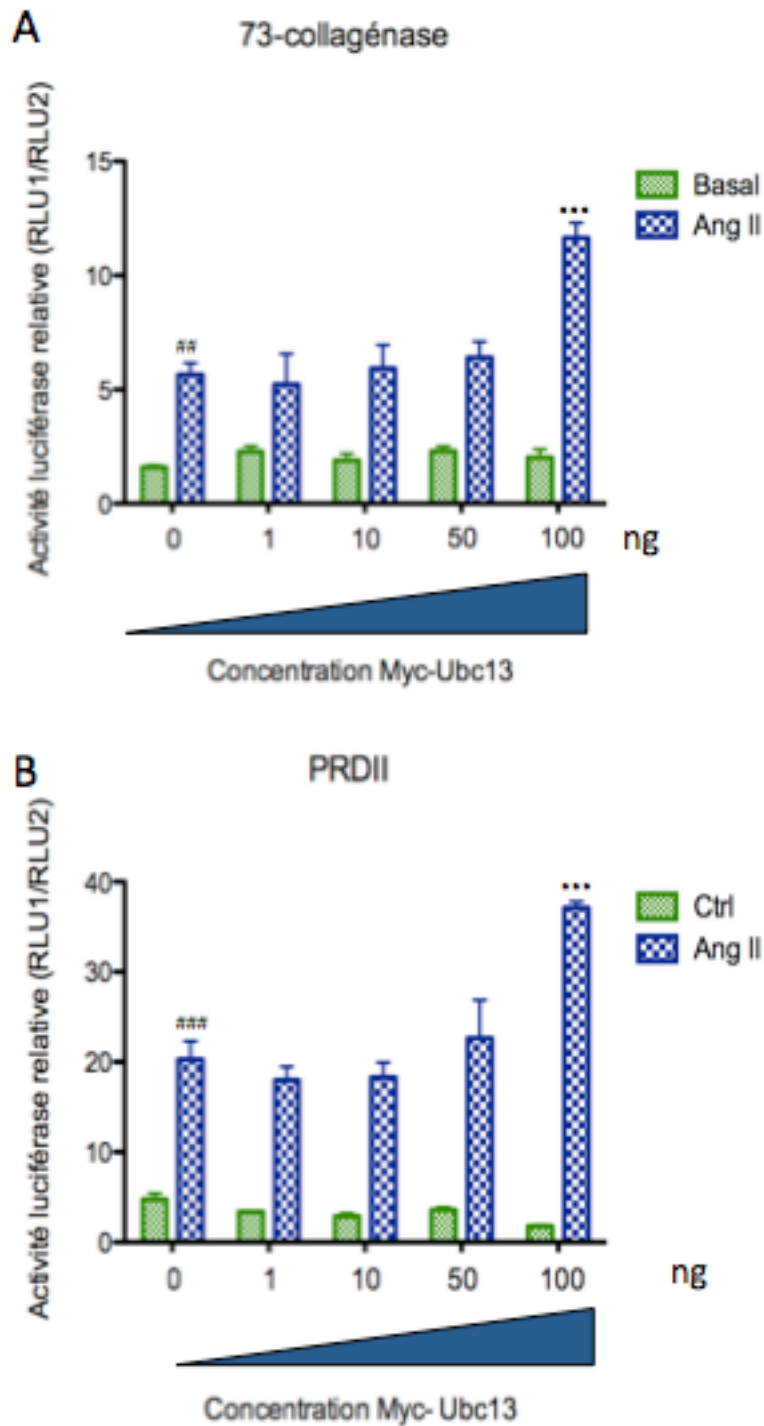
Des cellules 293Ad5 sont transfectées en présence de 100ng HA-AT1, 10ng pRL-TK, 200ng de rapporteur 73-collagénase (A) ou PRDII (B) et une dose croissante de Flag-TRAF6 tel qu'indiqué sur l'axe des x. La concentration d'ADN totale est complétée à 100ng par le vecteur pCMVTAG2B. 48 heures post-transfection les cellules quiescentes sont mises en présence de 1 $\mu$ M d'Ang II pendant 16 heures. Chaque condition est réalisée en duplicata. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences (A) ou de deux expériences indépendantes (B). Les données représentent la moyenne +/- SD. # Significativement au dessus de la condition sans traitement à l'Ang II. \* Significativement au dessus de la condition avec traitement à l'Ang II. Un seul symbole indique P<0,05, deux symboles indiquent P<0,001, trois symboles indiquent P<0,0001.

Suite à ces résultats, une construction Myc-Ubc13 est réalisée afin d'étudier l'implication de cette E2 dans l'activation de NF- $\kappa$ B et d'AP-1 pour ensuite étudier l'effet de l'expression des protéines TRAF6 et Ubc13 sur l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et d'AP-1 suite à un traitement à l'Ang II.

**Étude de l'implication d'Ubc13 dans l'activation de NF- $\kappa$ B et AP-1 dans les voies de l'Ang II**

Des essais luciférase sont réalisés avec les rapporteurs, PRDII et 73-collagénase, ainsi que des doses croissantes du vecteur Myc-Ubc13 en présence ou non d'Ang II afin de vérifier la concentration optimale d'Ubc13 à utiliser en essais luciférase en présence de TRAF6. La stimulation à l'Ang II des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B par l'Ang II est induite de façon significative, soit de 3,5 fois pour AP-1 (Figure 15A, page 84) et de 4,3 fois pour NF- $\kappa$ B (Figure 15B, page 84) en comparaison avec le basal. La surexpression de Myc-Ubc13 à une concentration de 100ng induit l'activation transcriptionnelle de AP-1 de 5,8 fois et permet l'induction transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B de 20,7 fois lors d'un traitement

à l'Ang II (Figure 15A&15B, page 84). Ainsi, Ubc13 peut induire l'activation de ces deux facteurs de transcription démontrant ainsi son implication dans ces voies de signalisation. La concentration optimale à utiliser est de 100ng de la construction Myc-Ubc13.



**Figure 15 : Induction de gènes rapporteurs luciférase sous contrôle des promoteurs 73-collagénase (A) ou PRDII (B) à des doses croissantes d'Ubc13 dans des 293Ad5 traitées à l'Ang II.**

Des cellules 293Ad5 sont transfectées en présence de 100ng HA-AT1, 10ng pRL-TK, 200ng de rapporteur PRDII ou 73-collagénase et une dose croissante de Myc-Ubc13 tel qu'indiqué sur l'axe des x. La concentration d'ADN totale est complétée à 100ng par le vecteur pCMVTAG2B. 48 heures post-transfection les cellules quiescentes sont mises en présence de 1 $\mu$ M d'Ang II pendant 16 heures. Chaque condition est réalisée en duplicata. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences (A) ou de deux expériences indépendantes (B). Les données représentent la moyenne +/- SD. # Significativement au dessus de la condition sans traitement à l'Ang II. \* Significativement au dessus de la condition avec traitement à l'Ang II. Un seul symbole indique P<0,05, deux symboles indiquent P<0,001, trois symboles indiquent P<0,0001.

Puisque TRAF6 et Ubc13 sont impliquées dans les voies de signalisation menant à l'activation d'AP-1, un essai luciférase est effectué en présence des concentrations optimales obtenues dans les essais précédents, soit 100ng de TRAF6 et 100ng d'Ubc13 en présence du rapporteur 73-collagénase. L'activation du facteur de transcription AP-1 par l'Ang II est de 2,4 fois (Figure 16, page 86). Tel qu'obtenu précédemment, la surexpression de TRAF6 induit AP-1 cependant dans ce cas, Ubc13 seul n'a pas d'effet sur l'activation d'AP-1 lors d'un traitement à l'Ang II. Par contre, aucun effet synergique ni additif n'est obtenu par la combinaison de TRAF6 et Ubc13 (Figure 16, page 87).

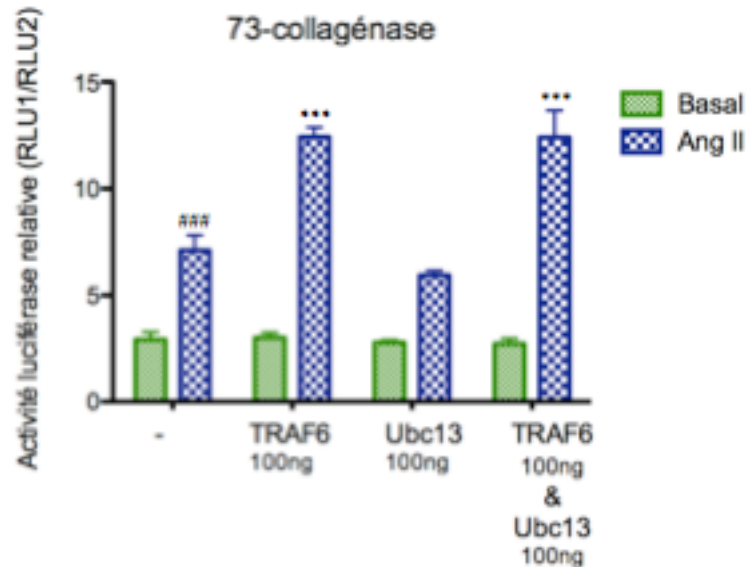


Figure 16 : **Induction de gènes rapporteurs luciférase sous contrôle du promoteur 73-collagénase en présence de TRAF6 et d'Ubc13 dans des 293Ad5 exposées à l'Ang II.**

Des cellules 293Ad5 sont transfectées en présence de 100ng HA-AT1, 10ng pRL-TK, 200ng de rapporteur 73-collagénase et 100ng de Flag-TRAF6 ou 100ng de Myc-Ubc13. La concentration d'ADN totale est complétée à 200ng par le vecteur pCMVTAG2B. 48 heures post-transfection les cellules quiescentes sont traitées par 1 $\mu$ M d'Ang II pendant 16 heures. Chaque condition est réalisée en triplicata. Les données représentent la moyenne +/- SD. # Significativement au dessus de la condition sans traitement à l'Ang II. \* Significativement au dessus de la condition avec traitement à l'Ang II. Un seul symbole indique P<0,05, deux symboles indiquent P<0,001, trois symboles indiquent P<0,0001.



### **3.3 Objectif 3 : Étude de la polyubiquitination en K63 dans les voies de l'Ang II**

#### **Caractérisation de l'anticorps anti-ubiquitine K63**

Les études sur le processus d'ubiquitination ainsi que ses rôles ne sont encore qu'au commencement dû à la faible disponibilité d'outils présents sur le marché. Cependant, au cours des prochaines années de nombreux avancés sur l'implication de cette modification post-traductionnelle seront réalisées dû à la diversité des nouveaux outils développées (Wang et al., 2008). Au départ, afin d'étudier les protéines ciblées par le processus de polyubiquitination en K63 dans les voies de signalisation de l'Ang II la caractérisation d'un anticorps anti-ubiquitine K63 est entreprise. Ceci est réalisé par l'utilisation de vecteurs encodant pour différents mutants de l'ubiquitine, soit HA-ubiquitine K48R et HA-ubiquitine K63R où toutes les lysines sont disponibles au processus de polyubiquitination sauf celle mentionnée, qui est changée par un résidu arginine (R). L'arginine est un acide aminé ayant les mêmes propriétés que la lysine, soit polaire et chargé positivement, mais qui ne peut pas être utilisé dans le processus d'ubiquitination. L'anticorps anti-ubiquitine P4D1, reconnaissant l'ubiquitination totale, reconnaît sensiblement les mêmes bandes d'un puits à l'autre, selon la quantité de plasmides transfectés, suggérant une efficacité de transfection similaire d'une condition à l'autre. Une diminution des bandes reconnues par l'anticorps anti-ubiquitineK63 est observée dans le puits HA-Ubi K63R comparativement aux autres puits et ce majoritairement pour les protéines de plus de 66 kDa. (Figure 17, page 88). Ainsi, l'anticorps anti-ubiquitine K63 semble spécifique à la reconnaissance des protéines polyubiquitinées en K63.

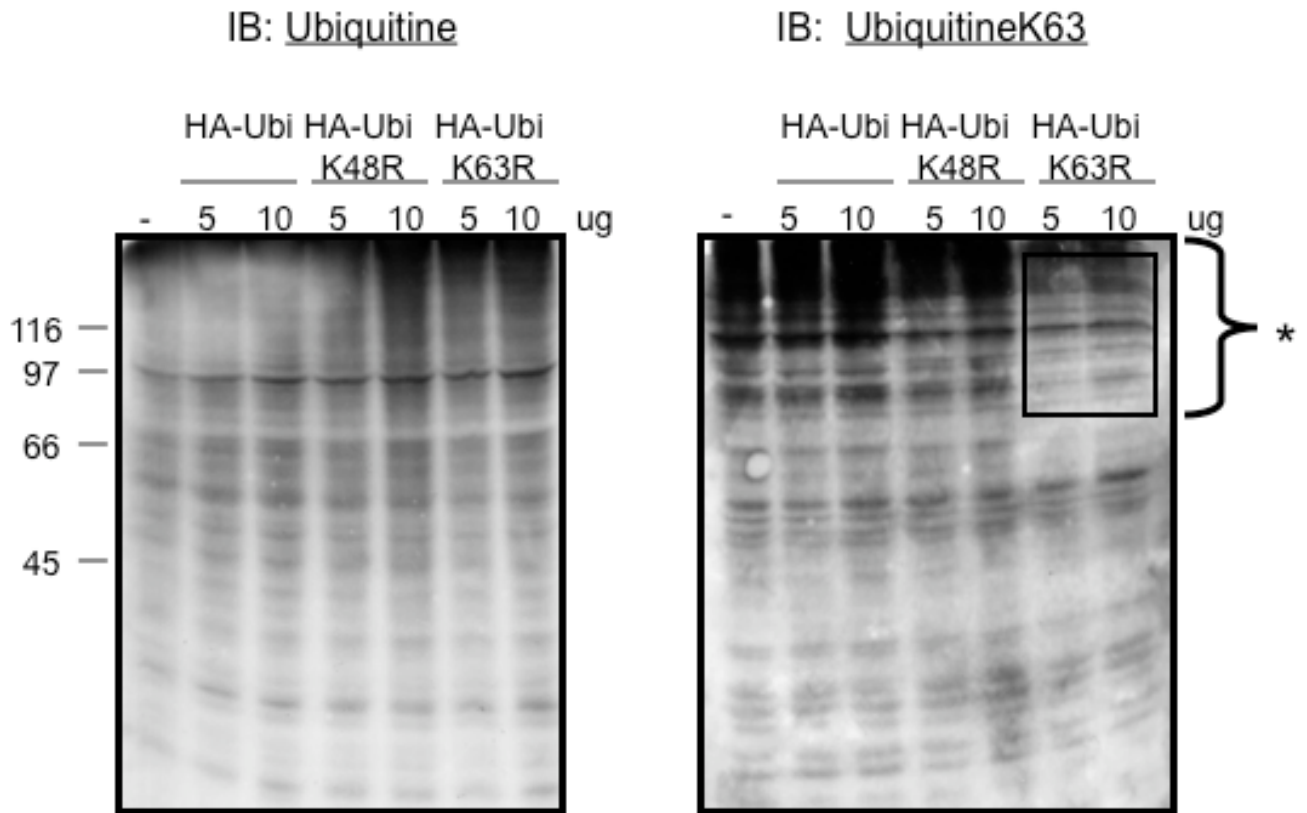


Figure 17 : L'anticorps anti-ubiquitine K63 est spécifique.

Des cellules 293Ad5 sont transfectées par différentes concentrations des vecteurs HA-ubiquitine (HA-Ubi), HA-ubiquitine K48R (HA-Ubi K48R), HA-ubiquitine K63R (HA-Ubi K63R) ou pCMVTAG2B (-) et complétées à 10ug total d'ADN par pCMVTAG2B. 48 heures post-transfection, les lysats protéiques sont analysés sur gel SDS 12% par l'utilisation des anticorps ubiquitine P4D1 (2 $\mu$ g/ml) ou ubiquitine K63 (125ng/ml). Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

\* Diminution de l'ubiquitination en K63

### **Mise en place d'un protocole permettant l'étude des protéines ubiquitinées en K63 par l'Ang II**

Ensuite, afin d'étudier la polyubiquitination en K63 suite à un traitement à l'Ang II, la mise au point d'un système d'étude robuste dans un modèle hétérologue, soit des cellules 293Ad5 est réalisée. Au départ, les cellules sont transfectées par un plasmide encodant pour le AT1R (HA-AT1) et une construction encodant pour l'ubiquitine dont seulement la K63 est disponible au processus de polyubiquitination et contenant une étiquette de six histidines en N-terminal (His K63ubi). Les cellules sont mises en présence ou non d'Ang II puis le lysat protéique est purifié en conditions dénaturantes par chromatographie d'affinité suite à l'utilisation d'une colonne d'affinité au nickel. Selon cette expérience, une augmentation de la polyubiquitination totale en K63 est observée suite à un traitement à l'Ang II et ce particulièrement après 60 minutes d'exposition (Figure 18, page 90). Cependant, dès 30 minutes de traitement à l'Ang II, de nouvelles bandes sont distinguées entre 66 à 116kDa discernant des protéines ubiquitinées en K63. L'utilisation du TNF $\alpha$  comme contrôle ne semble pas démontrer une intensité totale du signal d'ubiquitination distinct du traitement à l'Ang II. Aucune traînée n'est visualisée dans les puits dans lesquels la construction His ubiquitine K63 n'a pas été transfectée dénotant que la purification sur colonne a bien fonctionné. De plus, afin de vérifier l'efficacité de cette purification, la construction Flag-NEMO est utilisée à des fins de contrôle puisque cette protéine est polyubiquitinée en K63 lorsqu'elle est surexprimée. La protéine NEMO n'est pas purifiée sans la présence du vecteur His-ubiquitine K63. L'utilisation du TNF $\alpha$  comme contrôle positif permet de visualiser un patron distinct comparé à l'Ang II mais un signal total équivalent. Cette technique de purification semble robuste et identifie de nouvelles protéines polyubiquitinées en K63 suite à un traitement à l'Ang II.

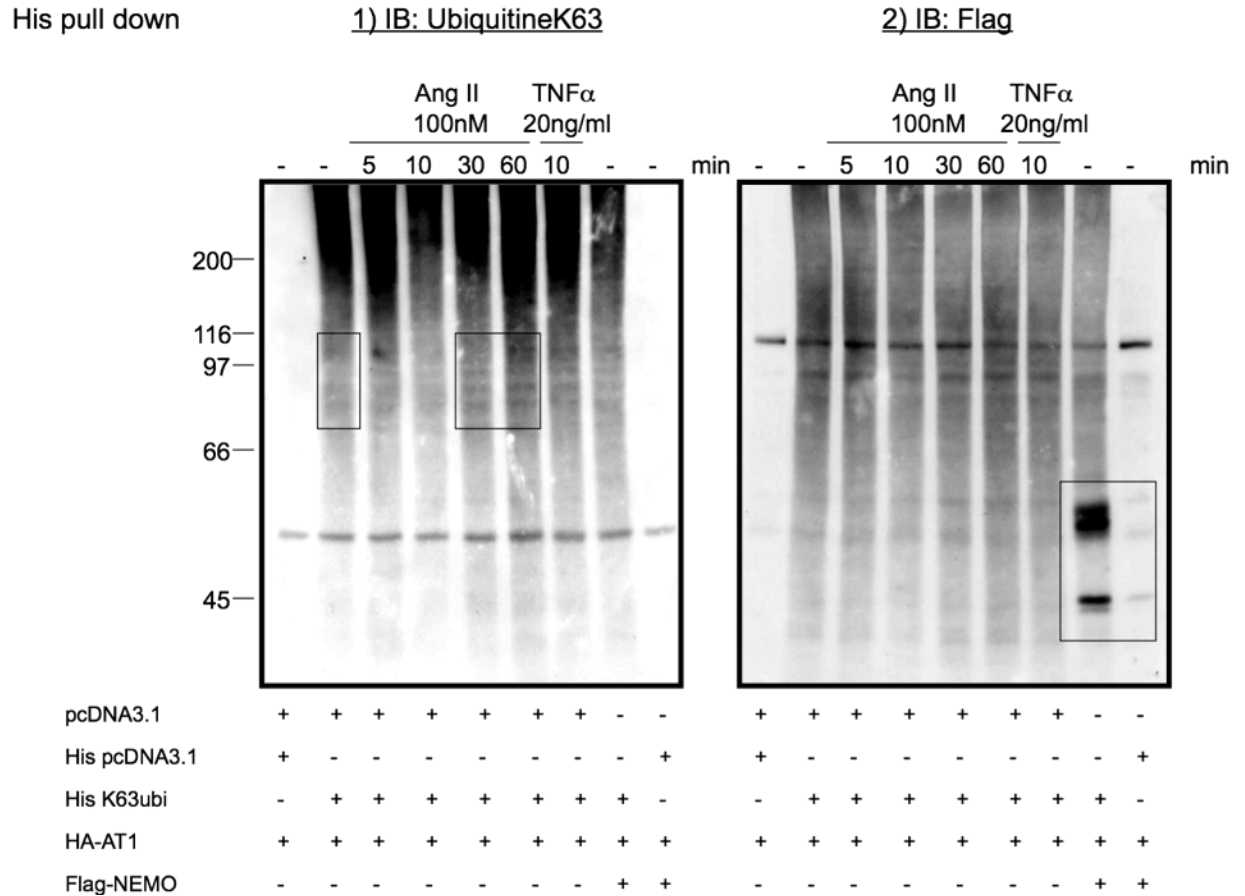


Figure 18 : L'Ang II induit la polyubiquitination en K63 de certaines protéines.

Des cellules 293Ad5 sont transfectées par 4 $\mu$ g de chacun des vecteurs indiqués. 48 heures post-transfection les cellules sont exposées à 100nM d'Ang II pour divers temps puis les lysats protéiques sont purifiés sur colonne de nickel puis séparés sur gel SDS 7,5% et analysés par l'anticorps anti-ubiquitine K63. Par la suite, la même membrane est analysée par un anticorps anti-Flag (1 $\mu$ g/ml). Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes.

## Chapitre IV : Discussion

Le rôle de l'inflammation dans le développement des maladies cardiovasculaires est maintenant reconnu. Cet aspect a permis des avancés étonnants en médecine par l'identification de biomarqueurs permettant de diagnostiquer ces pathologies à des stades plus précoces. Actuellement, la *C-reactive protein* (CRP), un marqueur de l'inflammation, est utilisé afin de détecter le développement potentiel de l'athérosclérose chez les patients (Kampoli et al., 2009). Le rôle primordial de la composante inflammatoire dans le développement de cette pathologie a permis de cibler l'étude des voies moléculaires impliquées. La compréhension de ces voies de signalisation est primordiale à la prévention de la progression des maladies cardiovasculaires par l'identification des biomarqueurs ainsi que par la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Différentes études illustrent que les rôles proinflammatoires de l'Ang II, un régulateur de la pression artérielle, via son AT1R, sont importants dans le développement de cette maladie. D'ailleurs, l'Ang II est impliqué dans tous les stades de développement de l'athérosclérose, passant par la dysfonction endothéliale, le recrutement des leucocytes, la prolifération et la migration des CMLV ainsi que dans la rupture de la plaque athérosclérotique. La majorité des actions de l'Ang II sont accomplies via l'activation d'une variété de cascades de signalisation dont les voies MAPKs, PI3K et NF- $\kappa$ B. La diversité de stimulus permettant d'activer NF- $\kappa$ B, un médiateur central de la réponse inflammatoire, ainsi que son implication dans l'athérosclérose démontre son importance dans le développement de thérapies de l'avenir. Il est ainsi primordial de caractériser les protéines et les modifications post-traductionnelles impliquées dans l'activation de ce facteur de transcription afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Puisque l'activation du complexe IKK joue un rôle clé dans cette voie de signalisation, mon projet de recherche visait à identifier les protéines impliquées dans la polyubiquitination de NEMO, sous-unité régulatrice du complexe IKK ainsi qu'à caractériser l'implication de la polyubiquitination en K63 dans les effets proinflammatoires de l'Ang II.

Au départ, afin d'étudier les protéines impliquées dans la polyubiquitination de NEMO, nous avons ciblées Ubc13 et TRAF6. Ces protéines sont reconnues pour leur rôle dans l'élongation de chaînes d'ubiquitines en K63 ainsi que pour leur implication dans l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, dans le système immunitaire inné, des souris déficientes en TRAF6 présentent une absence d'activation de NF- $\kappa$ B suite à l'exposition à l'IL-1 $\beta$ . De plus, la déficience en Ubc13 dans des MEF traitées à l'IL-1 $\beta$  inhibe la polyubiquitination de NEMO (Skaug et al., 2009). Par ailleurs, dans la voie d'activation d'un GPCR, suite à l'exposition au LPA, TRAF6 est impliqué dans l'activation du complexe IKK indépendamment de la phosphorylation de IKK $\beta$  mais le rôle de la E2 est encore inconnue (Grabiner et al., 2007; Sun and Lin, 2008).

### **Étude d'Ubc13**

Dans un premier temps, afin d'étudier le rôle d'Ubc13 dans le système cardiovasculaire, nous avons créé des populations stables de CMLV exprimant un shARN contre cette protéine d'intérêt. Selon notre étude, la diminution de l'expression d'Ubc13 par shARN a entraîné une divergence dans les résultats obtenus selon les populations cellulaires (Figure 10, page 70). En effet, dans les populations #35 et #38, l'expression protéique d'Ubc13 est similaire cependant la phosphorylation des MAPKs et du complexe IKK obtenus suite à l'exposition des CMLV à l'Ang II est distincte. Cette différence peut s'expliquer par les effets secondaires engendrés suite à l'insertion du shARN. En effet, le changement de phénotype observé dans la population shUbc13 #35 est possiblement causé par l'introduction d'une trop grande quantité de shARN dans la cellule ce qui a débousolé son homéostasie. Des études réalisées par shARN révèlent que l'introduction de séquences distinctes de shARN ciblant le même gène dans la cellule, présentant une diminution de l'expression protéique similaire, mais disposant d'un phénotype distinct est causé par un effet non spécifique (Xu et al., 2009b). La quantification du titre viral avant l'infection des CMLV aurait pu éliminer ce problème. En effet, lors de la production des lentivirus dans les cellules d'emballage, l'efficacité de transfection peut différer d'un pétri à l'autre entraînant un titre viral distinct. Une panoplie de techniques sont utilisées afin de quantifier

le titre viral. Entre autre, la quantification de l'ARN ou de l'expression protéique de la protéine de la capsid p24 respectivement par RT-PCR ou par ELISA sont des méthodes de choix (Geraerts et al., 2006). Cependant, ces techniques sont limitées puisqu'elles quantifient les protéines virales mais elles ne considèrent pas la capacité d'infection des lentivirus. Ainsi, une seconde expérience peut être réalisée en parallèle afin de déterminer la *multiplicity of infection* (MOI) que l'on doit utiliser afin d'obtenir une diminution de l'expression de la protéine d'intérêt qui engendre le moins d'effets non spécifiques. Ainsi, je recommande l'infection des CMLV selon trois concentration distinctes de lentivirus par shARN (GFP ou shUbc13) afin d'utiliser la concentration minimale de virus permettant une diminution de l'expression protéique d'au moins 80% de la protéine d'intérêt. Cette technique est utilisée en laboratoire afin de diminuer les effets non-spécifiques du shARN. En effet, suite à l'analyse de l'expression de l'ARNm du gène d'intérêt par PCR en temps réel pour chacune des concentrations on peut choisir celle engendrant le moins d'effets non spécifiques (Anastasov et al., 2009). Une nouvelle approche est l'utilisation de vecteurs bicistroniques permettant l'expression de deux protéines sous le contrôle d'un seul promoteur. Ainsi, l'expression d'un siARN et de la protéine GFP sous le contrôle du même promoteur permet de visualiser l'efficacité de transfection entre chacun des puits (Millipore, 2009). Cependant les vecteurs que nous avons utilisé afin d'étudier Ubc13 ne comportent pas ce gène, mais cela serait une approche à utiliser dans l'avenir du laboratoire.

Suite à l'obtention des populations cellulaires d'intérêt, une seconde technique est utilisée en laboratoire afin de s'assurer que l'effet observé est causé par la diminution de la protéine d'intérêt. Cette technique est la complémentation des cellules, soit la réintégration du gène de la protéine d'intérêt par diverses techniques dont l'électroporation, l'utilisation d'agents de transfection tel la lipofectamine 2000 ou encore par une seconde infection virale. En effet, la réintroduction de la protéine étudiée provenant d'une espèce distincte dans la cellule peut démontrer que l'effet observé est causé seulement par la diminution de l'expression de la protéine d'intérêt (Vandekerckhove et al., 2006). Dans notre étude, la

complémentation des CMLV n'a pas fonctionné dû à l'homologie de séquence entre la protéine Ubc13 chez le rat et chez l'humain. La construction d'un vecteur disposant d'une version mutée des nucléotides d'Ubc13 mais encodant pour la même séquence protéique permettrait de contourner le problème occasionné par le shARN. En effet, puisque la séquence en nucléotides serait distincte, la dégradation de cet ARNm ne pourrait être déclenché dans la cellule et le gène Ubc13 serait de nouveau exprimé (Xu et al., 2009a). D'autre part, l'utilisation d'un shARN ciblant la partie non codante de l'ARNm, soit le 3' UTR permettrait de contourner le problème. En effet, ce shARN ne peut cibler la protéine lors de la complémentation.

Dans un second lieu, afin d'étudier le rôle d'Ubc13, nous avons utilisé des siARN contre la protéine Ubc13 dans des CMLV exposées à l'Ang II. Les résultats obtenus par siARN sont similaires à ceux obtenus dans les populations shARN Ubc13 #38 et #50, soit aucun changement dans la phosphorylation des MAPKs et de IKK (Figure 12B, page 76). Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'Ubc13 seul n'est pas impliquée dans la phosphorylation du complexe IKK et des MAPKs ERK, JNK et p38. Cependant, la littérature suggère que la déficience en une protéine d'intérêt peut activer des mécanismes de compensations cellulaires. Par la combinaison de siARN contre trois E2 distinctes, notre étude semble suggérer cette proposition et ce à deux niveaux. Tout d'abord, la diminution de l'expression d'une E2 par siARN semble augmenter l'expression protéique d'autres E2. Ensuite, une diminution de la phosphorylation des MAPKs, du complexe IKK ainsi que de Akt sont visualisés suite à la combinaison de siARN contre les protéines Ubc7 et Ubc13 dans des CMLV exposées à l'Ang II (Figure 13B, page 78). Les E2 Ubc5 et Ubc7 ont été ciblées pour l'étude puisqu'elles sont impliquées dans les voies d'activation de NF- $\kappa$ B à différents niveaux. En effet, Ubc5 est reconnu pour son implication dans la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ . De plus, dans la voie du TNF $\alpha$ , Ubc5c est l'enzyme impliquée dans l'activation du complexe IKK (Xu et al., 2009a; Zeng et al., 2009). L'enzyme Ubc7 facilite la polyubiquitination en K63 liée à TRAF6 (Yamamoto et al., 2006a). Au cours des



prochaines années, il est tout à fait possible que d'autres E2 soient impliquées dans l'activation de NF- $\kappa$ B. Il sera alors essentiel de vérifier leur effet dans les voies de l'Ang II.

Les techniques de siARN et de shARN sont de plus en plus utilisées dans les articles scientifiques depuis quelques années. Ces techniques engendrent toutes les deux la diminution de l'expression d'une protéine d'intérêt mais elles comportent chacune leur avantages et leur inconvénients. En effet, la technique du shARN permet de créer des populations stables exprimant un shARN d'intérêt conservé tout au long des passages cellulaires dû à leur intégration dans le génome ainsi que par leur sélection avec un antibiotique précis. Par contre, le shARN s'intègre au hasard dans le génome cellulaire et peut ainsi occasionner des effets non désirés. Cette méthode est plus ardue puisque la création de populations stables peut prendre des mois. La technique de siARN, quant à elle, permet un criblage rapide de la fonction protéique. Par contre, tout doit être recommencé à zéro pour chaque expérience. Puisque des populations cellulaires exprimant un shARN contre Ubc13 sont déjà réalisées, il pourrait être possible d'utiliser ces populations par la transfection des siARN Ubc5 ou Ubc7 afin d'étudier le rôle de ces E2.

La connaissance des outils mis à notre disposition afin d'étudier Ubc13 ainsi que le rôle de l'ubiquitination est essentielle. En effet, la faible disponibilité d'outils à l'étude de l'ubiquitination en fait un sujet difficile à couvrir. Dans la littérature, les résultats obtenus suite à l'étude de la protéine Ubc13 sont controversés dû aux avantages et aux inconvénients apportés par les techniques utilisées par les groupes de recherche. Ces techniques entraînent une disparité dans les résultats obtenus sur le rôle d'Ubc13 dans l'activation de NF- $\kappa$ B. Certaines études identifient un rôle primordial à Ubc13 dans l'activation de NF- $\kappa$ B (utilisation des siARN) tandis que d'autres lui reconnaissent un rôle seulement partiel (utilisation dominant négatif Ubc13C87A) complexifiant son étude (Yamamoto et al., 2006a). La majorité des dernières études effectuées sur les fonctions de cette protéine ont utilisé des souris transgéniques. Le génome de ces souris contient un gène Cre sous la dépendance d'un promoteur tissu spécifique permettant la déficience d'un gène flanqué de deux sites loxP, dans ce cas-ci Ubc13. L'ablation conditionnelle de ce gène est

développée puisque la déficience en Ubc13 entraîne la mort embryonnaire prématurée des souris. Par contre, le phénotype des souris Ubc13<sup>+/-</sup> est normal et ces animaux sont fertiles. C'est par l'utilisation de cette technique que les premiers pas sur la compréhension du rôle agoniste et tissu spécifiques d'Ubc13 ont été caractérisés. En effet, l'étude de la déficience conditionnelle en Ubc13 dans des macrophages démontre son implication dans la polyubiquitination de NEMO dans la voie de l'IL-1 $\beta$  ainsi que dans l'activation des voies MAPKs suite à une stimulation à divers ligands dont le LPS et l'IL-1 $\beta$  à l'exception du TNF $\alpha$  (Yamamoto et al., 2006a). Les résultats obtenus sur le rôle d'Ubc13 dans la signalisation des TCR par l'ablation conditionnelle d'Ubc13 dans des thymocytes sont distincts. L'étude démontre l'implication d'Ubc13 dans l'activation des MAPKs JNK et p38 sans agir sur la phosphorylation de ERK et implique la diminution de la polyubiquitination de NEMO ainsi que de l'activation précoce de NF- $\kappa$ B (Yamamoto et al., 2006b). Nos résultats semblent correspondre à ceux obtenus par l'étude de l'IL-1 $\beta$  puisque toutes les MAPKs sont touchées par la déficience en Ubc7 et Ubc13. Cependant, la stratégie d'ablation conditionnelle d'Ubc13 peut être incomplète dans certains types cellulaires. Cela peut être ce que l'on obtient dans notre cas, puisque la diminution de l'expression protéique d'Ubc13 n'est pas de 100%. L'activité des protéines résiduelles peut permettre l'accomplissement de leur activité et doit être considérée. De plus, la déficience en une protéine peut activer des mécanismes de compensations cellulaires tels que rencontrés dans notre étude et permettent d'accomplir la tâche normale de la protéine. En plus, cette technique est critiquée puisque la diminution de l'expression d'Ubc13 peut influencer la régulation de plusieurs protéines dans la cellule. En effet, la déficience en Ubc13 peut modifier l'activité de nombreuses protéines autre que NEMO par l'inhibition de leur polyubiquitination en K63. Ces protéines peuvent avoir un rôle dans les voies d'activation de NF- $\kappa$ B et des MAPKs. Dans la littérature, une équipe s'est penchée sur ce dernier point par l'étude de la polyubiquitination de NEMO suite à la stimulation de macrophages au LPS. La comparaison de la phosphorylation des MAPKs ainsi que de l'activité de NF- $\kappa$ B dans des cellules exprimant une version sauvage de NEMO ou une version mutée du site de polyubiquitination de NEMO, NEMOK392R donne des résultats similaires suite à une

stimulation au LPS (Ni et al., 2008). Ainsi, cette étude suggère que la diminution de l'activité des MAPKs et de NF- $\kappa$ B dans les études précédentes (Yamamoto et al., 2006a; Yamamoto et al., 2006b) sont causées par la diminution de l'activité d'une autre protéine modifiée par Ubc13 autre que NEMO. Dans notre étude, la diminution de la phosphorylation des MAPKs, de Akt et de IKK obtenus par la combinaison de siARN contre les E2 peut être causé par la diminution de la polyubiquitination d'autres protéines que NEMO. Il est alors primordial de s'assurer que cette observation est causée par la diminution de la polyubiquitination de NEMO. Ainsi, la première étape serait d'effectuer des immunoprécipitations de NEMO dans des CMLV déficientes ou non en Ubc13, exposées à l'Ang II. Ces extraits seraient ensuite analysés par l'utilisation d'un anticorps anti-ubiquitine ou anti-ubiquitine K63. De plus, des essais kinases IKK *in vitro* pourraient confirmer l'importance de cette modification post-traductionnelle dans les voies moléculaires de l'Ang II. Bien sûr, une technique similaire à celle décrite précédemment par la transfection de NEMOK392R pourrait être effectuée et confirmerait le rôle obligatoire de la polyubiquitination de NEMO en K63. Par contre, il faudrait réussir à transfecter les CMLV par de l'ADN, protocole qui n'est pas établi dans le laboratoire. En parallèle, dans ces expériences, des CMLV pourraient être stimulées au TNF $\alpha$  afin de servir de contrôle puisque la polyubiquitination de NEMO est engendrée par Ubc5c (Xu et al., 2009a).

Comme mentionné précédemment, la liaison du LPA à son GPCR active le complexe IKK selon deux voies moléculaires distinctes. L'une impliquant la phosphorylation du complexe IKK et l'autre la polyubiquitination de NEMO (Sun and Lin, 2008). Au niveau du AT1R, les mécanismes d'activation du complexe IKK sont inconnus. Il serait alors possible que l'activation du complexe IKK converge par deux voies moléculaires distinctes. Dans nos expériences, la visualisation de la phosphorylation de IKK $\beta$  suggère l'activité du complexe mais ne prouve pas que celui-ci est actif. La réalisation d'essais kinase IKK *in vitro* dans des CMLV dont l'expression d'Ubc13 est diminuée par siARN permettrait de vérifier l'activation du complexe IKK suite à la

diminution de l'expression de cette protéine. De plus, l'activation du complexe pourrait être vérifiée par l'utilisation de PCR en temps réel permettant de visualiser la transcription du gène de l'IL-6 suite à un traitement à l'Ang II. Finalement, afin de fermer la boucle, un EMSA, permettant d'étudier la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN, pourrait être réalisé. Dans le cas de ces expériences, le TNF $\alpha$  pourrait être utilisé comme contrôle négatif et le LPA comme contrôle positif.

La limitation des techniques permettant d'étudier le processus d'ubiquitination ainsi que la diversité de protéines impliquées dans l'activation de NF- $\kappa$ B, selon les ligands, augmentent la complexité de l'étude des voies de signalisation de ce facteur proinflammatoire. Dernièrement, un groupe de recherche a mis au point un système inductible par la tétracycline permettant de remplacer l'ubiquitine endogène par des versions mutées de l'ubiquitine (Xu et al., 2009a). Au départ, des cellules sont transfectées par un vecteur shARN permettant la diminution de l'expression de l'ubiquitine endogène puis, suite à la sélection des clones exprimant peu d'ubiquitine endogène, ceux-ci sont transfectés par des vecteurs exprimant l'ubiquitine mutée. Ces études ont permis d'identifier Ubc13 comme la E2 essentielle à l'activation de IKK ainsi que la nécessité de la polyubiquitination en K63 dans les voies de l'IL-1 $\beta$ . De plus, cette étude a démontré l'implication de Ubc5c dans la polyubiquitination d'effecteurs ainsi que l'essentialité de l'ubiquitination autre qu'en K63 dans l'activation de IKK dans la voie du TNF $\alpha$ . Cette nouvelle stratégie a permis de distinguer les processus entre la voie de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$  (Xu et al., 2009a). Je crois qu'il serait important de tirer profit de cette technique dans l'étude de la polyubiquitination en K63 dans les voies proinflammatoires de l'Ang II en distinguant précisément la E2 impliquée ainsi qu'en vérifiant le rôle obligatoire de celle-ci dans l'activation de NF- $\kappa$ B.

## Étude de TRAF6

TRAF6 est une protéine adaptatrice, contenant une activité E3 ligase, impliquée dans la défense contre les pathogènes ainsi que dans l'activation des GPCR par l'activation de la voie proinflammatoire NF- $\kappa$ B. Dans notre étude, des essais préliminaires ont été effectués sur l'implication de TRAF6 dans les effets proinflammatoires et hypertrophiques de l'Ang II. Selon les résultats obtenus, TRAF6 semble un joueur important dans l'activation du facteur de transcription AP-1 dans les voies de l'Ang II (Figure 14A, page 80). Par contre, aucun effet synergique n'est obtenu suite à la transfection combinée de TRAF6 avec Ubc13 (Figure 16, page 84). Cependant, la transfection de son cofacteur, Uev1A, pourrait être réalisée puisque cela permettrait de favoriser la réaction d'ubiquitination. En effet, une étude effectuée par ubiquitination *in vitro* démontre l'implication de Uev1A dans la déstabilisation du complexe Ubc13-ubiquitine ce qui augmente la dissociation du complexe en présence de TRAF6 et suggère une augmentation de l'ubiquitination (Petroski et al., 2007). Dû à l'activation basale importante de NF- $\kappa$ B lors de la surexpression de TRAF6, les essais luciférase ne peuvent conclure à l'importance de cette protéine dans l'activation de NF- $\kappa$ B dans les voies de signalisation de l'Ang II (Figure 14B, page 81). Dans la littérature, des résultats similaires à ceux obtenus dans notre recherche sont démontrés sur l'implication de TRAF6 dans l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B dans la voie de l'IL-1 $\beta$  et pourront servir de contrôle positif dans la poursuite des études (Funakoshi-Tago et al., 2003). Pour l'instant, les résultats obtenus en ce qui a trait au rôle de TRAF6 dans l'activation d'AP-1 et de NF- $\kappa$ B sont par sa surexpression dans un modèle cellulaire hétérologue. Ainsi, d'autres techniques permettant l'étude de TRAF6 endogène devront être utilisées afin de compléter l'étude du rôle de cette protéine. En effet, le choix des techniques utilisées lors des études entreprises sur le rôle des protéines est primordial. En général, la surexpression de protéines dans un modèle cellulaire peut permettre d'identifier un rôle à celle-ci dans diverses voies moléculaires de façon rapide et peu coûteuse cependant il est primordial d'obtenir des résultats supplémentaires par l'utilisation de techniques ciblant le rôle de la protéine de

façon endogène. En effet, en surexpression, on ajoute une protéine d'intérêt de façon supra physiologique ce qui peut influencer de nombreuses voies cellulaires de façon non spécifiques. Les études endogènes tel que la diminution de l'expression d'une protéine par l'utilisation d'un siARN permet d'étudier de façon directe le rôle d'une protéine de choix qui était déjà exprimée dans la cellule. Ainsi, l'utilisation d'un siARN contre TRAF6 dans des CMLV exposées à l'Ang II pourrait permettre de cibler l'importance de cette protéine dans l'activation de NF- $\kappa$ B et d'AP-1. En effet, des analyses par immunobuvardage de la phosphorylation des MAPKS, de IKK et de Akt pourraient être effectuées. Ensuite, des immunoprécipitation contre NEMO ainsi qu'un blot ubiquitine ou ubiquitine K63 pourraient permettre de vérifier son ubiquitination selon ces conditions. La réciproque pourrait aussi être effectuée, soit une immunoprécipitation ubiquitine ou ubiquitine K63 suivi d'un blot NEMO. De plus, des essais kinases *in vitro* ERK, JNK, p38 et IKK ainsi que des PCR en temps réel pour l'IL-6 pourraient être réalisés. Toujours, des essais contrôles avec le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , le LPA ou le FBS pourront être réalisés en parallèle afin de valider les résultats obtenus.

Ensuite, afin d'étudier l'implication de l'activité E3 ligase de TRAF6 dans les voies moléculaires de l'Ang II, j'ai construit un plasmide encodant pour une version mutante de TRAF6 (Tableau II, page 98). En effet, la mutation de la Cys 70 en alanine permet d'inhiber l'activité ligase de cette protéine (Conze et al., 2008). Aucun essai préliminaire n'a encore été réalisé avec cette construction par contre, elle pourra être utilisée dans des essais de surexpression. En effet, la surexpression de TRAF6 et TRAF6C70A dans un modèle hétérologue permettra de visualiser la polyubiquitination de NEMO par l'utilisation des anticorps spécifiques à l'ubiquitine ou l'ubiquitine K63 suite à son immunoprécipitation. Cette expérience permettra de vérifier l'implication de l'activité E3 ligase de TRAF6 dans cette modification post-traductionnelle. Selon les résultats obtenus, des essais complémentaires pourront être effectués dont la vérification de la phosphorylation ainsi que l'activité du complexe IKK par des immunobuvardage et des

essais kinase *in vitro*. Ces essais permettront d'identifier si la polyubiquitination de NEMO par TRAF6 est essentielle à l'activité du complexe IKK.

Tableau II : **Séquence des oligonucléotides utilisés pour la construction du mutant TRAF6C70A.**

Nom de l'amorce	Séquence des oligonucléotides
FLAG-TRAF6C70A FW	GGAAAGCAAGTATGAAG <u>G</u> CCCCCATCTGCTTG
FLAG-TRAF6C70A RV	GCCATCAAGCAGATGGGG <u>G</u> CTTCATACTTGC

Les sites des mutations sont soulignés.

### Étude de la polyubiquitination en K63 dans les voies de l'Ang II

Le protocole permettant la caractérisation des protéines polyubiquitinées en K63 ciblées par l'Ang II en est encore à l'étape de la mise au point. La visualisation sur gel SDS de la reconnaissance de nouvelles bandes dans le temps suite à la stimulation à l'Ang II confirme l'implication de cette modification post-traductionnelle dans les voies de signalisation de ce ligand (Figure 18, page 88). La prochaine étape de cette expérience consiste à soumettre les échantillons en spectrométrie de masse MS-MS afin d'analyser les candidats ciblés par cette modification post-traductionnelle dans les voies de l'Ang II. Cependant, de nombreux facteurs peuvent interagir dans les lectures obtenus par spectrométrie de masse en masquant le signal, dont la présence d'agents surfactants et d'imidazole (Hefti et al., 2001). Dans notre protocole, lors de la procédure de purification sur colonne de nickel, les protéines contenant l'étiquette histidine sont éluées par l'ajout d'imidazole. Ce composé agit de façon compétitive avec les résidus histidines sur la résine de nickel ce qui permet l'élué des protéines d'intérêt. Cette technique, soit l'utilisation de la chromatographie d'affinité en conditions dénaturantes afin d'obtenir les protéines ubiquitinées suite à un traitement a déjà été utilisée par de nombreuses équipes (Campanero and Flemington, 1997; Meierhofer et al., 2008). Dans ces articles, la technique utilisée afin d'éliminer l'imidazole est la dialyse des échantillons recueillis suite à l'élué. Cependant,

cette méthode occasionne des pertes protéiques importante et il peut rester des traces d'imidazole dans l'échantillon protéique final (Hefti et al., 2001). Dans notre étude, nous devons ajouter des étapes supplémentaires qui n'affecteront pas la qualité ni la quantité de l'échantillon protéique avant d'envoyer les échantillons en analyse. Ainsi, nous ne pouvons utiliser la dialyse et devons éliminer l'étape finale d'éluion par l'imidazole.

Afin de continuer la mise au point d'un protocole robuste à l'étude des protéines polyubiquitinées en K63 dans les voies de l'Ang II, nous exploiterons les avantages de la construction His-ubiquitine K63 réalisée. Ce vecteur contient, entre son étiquette histidine et la séquence codante du gène ubiquitine (inséré par Not I), un site de reconnaissance par une protéase, l'entérokinase. (Figure 19, page 103). L'entérokinase est une sérine protéase spécifique à la séquence (Asp)<sub>4</sub>Lys. (Invitrogen, 2006). Le clivage des protéines par cette protéase permettra de libérer les protéines d'intérêt dans la fraction d'éluion sans avoir recours à l'utilisation d'imidazole. Cette technique a déjà été utilisée auparavant dans la littérature mais l'enzyme utilisée était la thrombine (Hefti et al., 2001). La qualité des échantillons récoltés suite à l'utilisation de cette protéase est remarquable et favorise l'utilisation de cette méthode dans la suite de nos expériences. Ainsi, des essais devront être réalisés avec l'entérokinase Max afin d'obtenir la concentration optimale d'enzyme à utiliser pour permettre le relâchement des protéines d'intérêt sans cliver des séquences de façon non spécifiques. Le lysat protéique recueilli contiendra de nombreuses protéines ubiquitine. Dû à leur forte concentration, ces protéines peuvent interférer dans la lecture obtenue par spectrométrie de masse. Afin de remédier à ce problème, ces protéines pourront être enlevées de la fraction voulue par l'utilisation de filtres Centricon. Les pores de ces filtres permettront de concentrer l'échantillon et de retirer les protéines de faible poids moléculaire dont l'ubiquitine d'environ 8 kDa. Finalement, le lysat recueilli pourra être envoyé en spectrométrie de masse en duplicata afin d'obtenir les protéines ciblées par l'Ang II. Par la suite, plusieurs études pourront être entreprises à partir des résultats obtenus. Dans la littérature, une équipe de recherche a identifié près de 669 protéines comme des substrats potentiels à l'ubiquitination dans des cellules Hela par l'utilisation



d'un système similaire au nôtre (Meierhofer et al., 2008). Ainsi, suite à l'obtention des protéines polyubiquitinées en K63 par l'Ang II, certains candidats pourront être ciblé pour des études plus approfondies afin de vérifier l'implication de cette modification post-traductionnelle sur la signalisation cellulaire de l'Ang II.

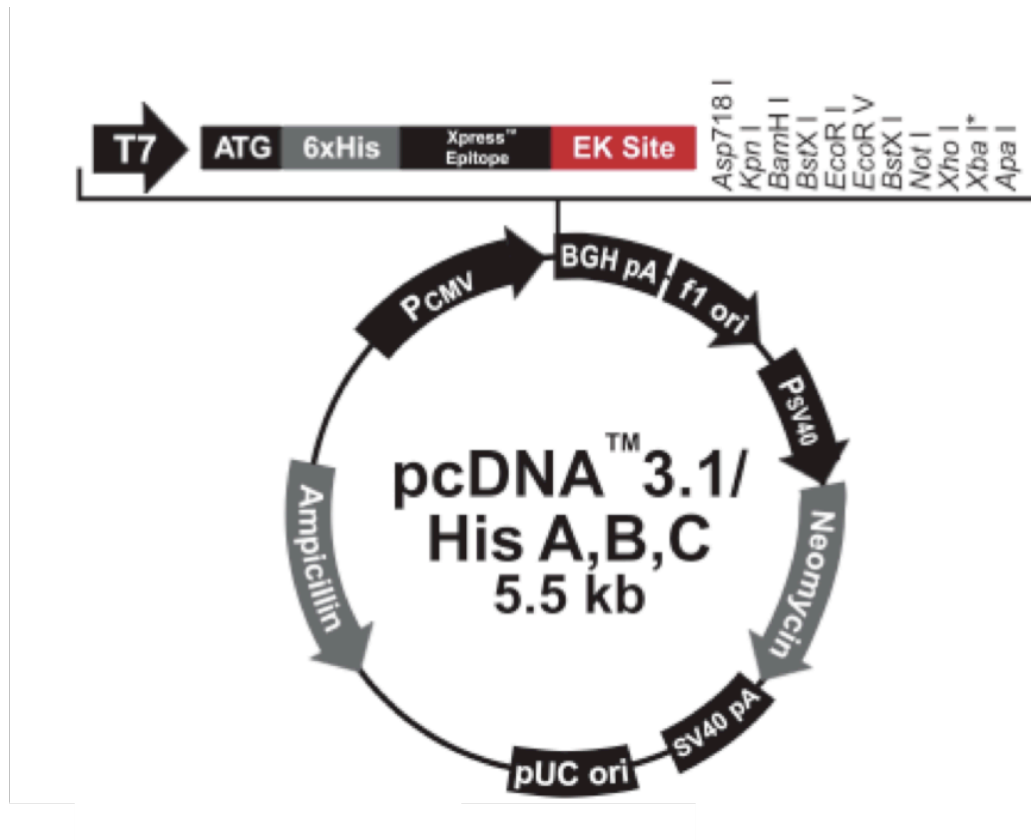


Figure 19 : Schéma du vecteur pcDNA3.1 His (Invitrogen, 2009) dans lequel le gène ubiquitine K63 est inséré.

Selon les résultats obtenus dans les cellules 293Ad5, cette méthode pourra être transposée dans des cellules primaires. Ainsi, cette technique débiterait tout d'abord par la création d'une population stable de CMLV exprimant la construction His ubiquitine K63 par infection lentivirale. Par la suite, ces cellules subiraient un traitement à l'Ang II puis les protéines ubiquitinées en K63 seraient purifiées par la procédure mise sur pied dans les 293Ad5 puis envoyées en spectrométrie de masse. Cela permettrait de choisir certains

candidats et étudier l'importance de leur ubiquitination dans les voies de signalisations de l'Ang II dans des CMLV.

## Conclusion

Pour conclure, les effets proinflammatoires de l'Ang II, un régulateur de la pression artérielle, sont impliqués dans tous les stades du développement de l'athérosclérose, entre autre, via l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'étude de l'implication de ce facteur est réalisée par de nombreux groupes de recherches à cause de son rôle de médiateur inflammatoire dans une variété de voie de signalisation. Les approches expérimentales utilisées au cours de cette étude ont permis d'illustrer un lien potentiel entre la signalisation cellulaire de l'Ang II et l'ubiquitination. Premièrement, l'utilisation de siARN a permis de suggérer l'implication des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, Ubc7 et Ubc13, dans la régulation de l'activation des voies moléculaires des MAPKs, du complexe IKK ainsi que de Akt dans des CMLV exposées à l'Ang II. Ensuite, des essais rapporteurs suggèrent un rôle possible pour l'enzyme ubiquitine ligase, TRAF6, dans l'activation du facteur de transcription AP-1 dans un modèle d'étude hétérologue traité à l'Ang II. D'autre part, cette étude a permis d'établir des outils solides à l'étude de la polyubiquitination en K63 dans les effets proinflammatoires de l'Ang II par le développement d'un protocole basé sur la chromatographie d'affinité. L'étude de la polyubiquitination est une voie d'avenir dans la compréhension des voies moléculaires de l'Ang II. En effet, cette modification post-traductionnelle est déjà reconnue pour son implication dans de nombreuses pathologies dont le cancer. Ainsi, la continuité de cette étude pourrait éventuellement permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement local des maladies cardiovasculaires tout en permettant une meilleure compréhension des voies de signalisation de l'Ang II.

## Bibliographie

Adhikari, A., and Chen, Z.J. (2009). Diversity of polyubiquitin chains. *Dev Cell* *16*, 485-486.

Anastasov, N., Klier, M., Koch, I., Angermeier, D., Hofler, H., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L. (2009). Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer. *J Hematop* *2*, 9-19.

Andersen, P.L., Zhou, H., Pastushok, L., Moraes, T., McKenna, S., Ziola, B., Ellison, M.J., Dixit, V.M., and Xiao, W. (2005). Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol* *170*, 745-755.

Andersson, J., Libby, P., and Hansson, G.K. (2010). Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* *134*, 33-46.

Bhoj, V.G., and Chen, Z.J. (2009). Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* *458*, 430-437.

Bradley, J.R., and Pober, J.S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* *20*, 6482-6491.

Brasier, A.R., Recinos, A., 3rd, and Eledrisi, M.S. (2002). Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *22*, 1257-1266.

Campanero, M.R., and Flemington, E.K. (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 2221-2226.

Chapman, M.J. (2007). From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacol Ther* *113*, 184-196.

- Chen, G., and Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-1635.
- Chen, Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7, 758-765.
- Choy, P.C., Siow, Y.L., Mymin, D., and O, K. (2004). Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol* 82, 212-224.
- Christensen, D.E., and Klevit, R.E. (2009). Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination. *FEBS J* 276, 5381-5389.
- Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H., and Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115, 679-688.
- Conze, D.B., Wu, C.J., Thomas, J.A., Landstrom, A., and Ashwell, J.D. (2008). Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 28, 3538-3547.
- de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52, 415-472.
- Douillette, A., Bibeau-Poirier, A., Gravel, S.P., Clement, J.F., Chenard, V., Moreau, P., and Servant, M.J. (2006). The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem* 281, 13275-13284.
- Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22, 245-257.
- Fondation des maladies du coeur (2010). L'hypertension artérielle.

- Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Sonoda, Y., Tominaga, S., and Kasahara, T. (2003). TRAF6 and C-SRC induce synergistic AP-1 activation via PI3-kinase-AKT-JNK pathway. *Eur J Biochem* 270, 1257-1268.
- Fyhrquist, F., and Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264, 224-236.
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z., and Gijsbers, R. (2006). Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 6, 34.
- Grabiner, B.C., Blonska, M., Lin, P.C., You, Y., Wang, D., Sun, J., Darnay, B.G., Dong, C., and Lin, X. (2007). CARMA3 deficiency abrogates G protein-coupled receptor-induced NF- $\kappa$ B activation. *Genes Dev* 21, 984-996.
- Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., and Hofmann, K. (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33, 230-237.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Hefti, M.H., Van Vugt-Van der Toorn, C.J., Dixon, R., and Vervoort, J. (2001). A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal Biochem* 295, 180-185.
- Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G.D., and Eguchi, S. (2007). Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* 112, 417-428.
- Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 20, 953-970.
- Invitrogen (2006). EnterokinaseMax E180-01.

Invitrogen (2009). pcDNA3.1-His A, B and C.

Kampoli, A.M., Tousoulis, D., Antoniadis, C., Siasos, G., and Stefanadis, C. (2009). Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med* *15*, 323-332.

Klemm, S., Zimmermann, S., Peschel, C., Mak, T.W., and Ruland, J. (2007). Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 134-138.

Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G., and Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* *59*, 251-287.

Kumar, R., and Boim, M.A. (2009). Diversity of pathways for intracellular angiotensin II synthesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* *18*, 33-39.

Li, C., and Xu, Q. (2000). Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* *12*, 435-445.

Li, S., Wang, L., and Dorf, M.E. (2009). PKC phosphorylation of TRAF2 mediates IKKalpha/beta recruitment and K63-linked polyubiquitination. *Mol Cell* *33*, 30-42.

Li, X.C., and Zhuo, J.L. (2008). Nuclear factor-kappaB as a hormonal intracellular signaling molecule: focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* *17*, 37-43.

Li, Y., Minamino, T., Tsukamoto, O., Yujiri, T., Shintani, Y., Okada, K., Nagamachi, Y., Fujita, M., Hirata, A., Sanada, S., *et al.* (2005). Ablation of MEK kinase 1 suppresses intimal hyperplasia by impairing smooth muscle cell migration and urokinase plasminogen activator expression in a mouse blood-flow cessation model. *Circulation* *111*, 1672-1678.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* *420*, 868-874.

- Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2009). Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54, 2129-2138.
- Lusis, A.J., Mar, R., and Pajukanta, P. (2004). Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 189-218.
- McAllister-Lucas, L.M., Ruland, J., Siu, K., Jin, X., Gu, S., Kim, D.S., Kuffa, P., Kohrt, D., Mak, T.W., Nunez, G., *et al.* (2007). CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 139-144.
- Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C82-97.
- Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L., and Kaiser, P. (2008). Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. *J Proteome Res* 7, 4566-4576.
- Millipore (2009). knock-down protocol.
- Min, L.J., Mogi, M., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2009). Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence. *Ageing Res Rev* 8, 113-121.
- Nalepa, G., Rolfe, M., and Harper, J.W. (2006). Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 5, 596-613.
- Newby, A.C., and Zaltsman, A.B. (1999). Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41, 345-360.
- Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., *et al.* (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 134, 668-678.



- Ni, C.Y., Wu, Z.H., Florence, W.C., Parekh, V.V., Arrate, M.P., Pierce, S., Schweitzer, B., Van Kaer, L., Joyce, S., Miyamoto, S., *et al.* (2008). Cutting edge: K63-linked polyubiquitination of NEMO modulates TLR signaling and inflammation in vivo. *J Immunol* 180, 7107-7111.
- Petroski, M.D. (2008). The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem* 9 *Suppl 1*, S7.
- Petroski, M.D., Zhou, X., Dong, G., Daniel-Issakani, S., Payan, D.G., and Huang, J. (2007). Substrate modification with lysine 63-linked ubiquitin chains through the UBC13-UEV1A ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* 282, 29936-29945.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- Pickart, C.M., and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8, 610-616.
- Raasi, S. (2009). Recognition of ubiquitin signals by UBA domains and its diversity.
- Rader, D.J., and Daugherty, A. (2008). Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904-913.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Santé Canada (2006). Guide de pratique clinique du personnel infirmier en soins primaires.
- Santé Canada (2008). Stratégie de modernisation de la réglementation sur les aliments et la nutrition de Santé Canada.
- Sanz, J., and Fayad, Z.A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451, 953-957.

- Schmid, J.A., and Birbach, A. (2008). IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 157-165.
- Schulman, B.A., and Harper, J.W. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 319-331.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., and Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 473-483.
- Shambharkar, P.B., Blonska, M., Pappu, B.P., Li, H., You, Y., Sakurai, H., Darnay, B.G., Hara, H., Penninger, J., and Lin, X. (2007). Phosphorylation and ubiquitination of the IkappaB kinase complex by two distinct signaling pathways. *EMBO J* 26, 1794-1805.
- Skaug, B., Jiang, X., and Chen, Z.J. (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 78, 769-796.
- Solt, L.A., Madge, L.A., Orange, J.S., and May, M.J. (2007). Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J Biol Chem* 282, 8724-8733.
- Statistiques Canada (2005). Décès, selon certains groupes de causes, le groupe d'âge et le sexe, Canada, annuel.
- Sun, J., and Lin, X. (2008). Beta-arrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17085-17090.
- Sun, W., Li, H., Yu, Y., Fan, Y., Grabiner, B.C., Mao, R., Ge, N., Zhang, H., Fu, S., Lin, X., *et al.* (2009). MEKK3 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal* 21, 1488-1494.
- Tang, E.D., Wang, C.Y., Xiong, Y., and Guan, K.L. (2003). A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of

the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 278, 37297-37305.

Thrane, E.V., Schwarze, P.E., Thoresen, G.H., Lag, M., and Refsnes, M. (2001). Persistent versus transient map kinase (ERK) activation in the proliferation of lung epithelial type 2 cells. *Exp Lung Res* 27, 387-400.

Topisirovic, I., Gutierrez, G.J., Chen, M., Appella, E., Borden, K.L., and Ronai, Z.A. (2009). Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12676-12681.

Tortora, G.J., Grabowski Sandra Reynolds (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*.

Touyz, R.M. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90, 449-455.

Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.

Vandekerckhove, L., Christ, F., Van Maele, B., De Rijck, J., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Witvrouw, M., and Debyser, Z. (2006). Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus. *J Virol* 80, 1886-1896.

Wang, H., Matsuzawa, A., Brown, S.A., Zhou, J., Guy, C.S., Tseng, P.H., Forbes, K., Nicholson, T.P., Sheppard, P.W., Hacker, H., *et al.* (2008). Analysis of nondegradative protein ubiquitylation with a monoclonal antibody specific for lysine-63-linked polyubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20197-20202.

Windheim, M., Peggie, M., and Cohen, P. (2008). Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 409, 723-729.

- Wu-Baer, F., Lagazon, K., Yuan, W., and Baer, R. (2003). The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* 278, 34743-34746.
- Xia, Z.P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., and Chen, Z.J. (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461, 114-119.
- Xu, M., Skaug, B., Zeng, W., and Chen, Z.J. (2009a). A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell* 36, 302-314.
- Xu, X.M., Yoo, M.H., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N., and Hatfield, D.L. (2009b). Simultaneous knockdown of the expression of two genes using multiple shRNAs and subsequent knock-in of their expression. *Nat Protoc* 4, 1338-1348.
- Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., *et al.* (2006a). Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 7, 962-970.
- Yamamoto, M., Sato, S., Saitoh, T., Sakurai, H., Uematsu, S., Kawai, T., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006b). Cutting Edge: Pivotal function of Ubc13 in thymocyte TCR signaling. *J Immunol* 177, 7520-7524.
- Yang, W.L., Wang, J., Chan, C.H., Lee, S.W., Campos, A.D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B.C., Lin, X., Darnay, B.G., *et al.* (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134-1138.
- Zeng, W., Xu, M., Liu, S., Sun, L., and Chen, Z.J. (2009). Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell* 36, 315-325.

Zhang, X.D., and Matunis, M.J. (2005). Ub in charge: regulating E2 enzyme nuclear import. *Nat Cell Biol* 7, 12-14.

