

Université de Montréal

**Expression de l'Early Growth Response Protein-1
(Egr-1) par le Peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂)
nécessite l'activation de l'IGF-1R, de c-Src et de
PKC dans les CMLV**

par

Vincent Rondeau

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales
option Générale

Décembre 2016

© Vincent Rondeau, 2016

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Expression de l'Early Growth Response Protein-1
(Egr-1) par le Peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂)
nécessite l'activation de l'IGF-1R, de c-Src et de
PKC dans les CMLV**

Présenté par :
Vincent Rondeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : D^r Puttaswamy Manjunath
Directeur de recherche : D^r Ashok K. Srivastava
Membre du jury : D^r Shao-Ling Zhang

Résumé

Une augmentation de la génération des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), joue un rôle clé dans la pathophysiologie des maladies cardiovasculaires (MCV). La croissance et la prolifération excessives des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ont été suggérées comme étant les mécanismes à la base de la dysfonction vasculaire. Une implication potentielle du facteur de transcription *Early growth response protein-1* (Egr-1) dans le développement des dommages vasculaires a été proposée. Des études ont démontré que le H_2O_2 augmente l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV. Cependant, les voies de signalisation intracellulaire menant à l'expression de l'Egr-1 en réponse au H_2O_2 restent à établir. L'objectif de cette étude vise à examiner les différentes voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par le H_2O_2 dans les CMLV. Le H_2O_2 augmente l'expression de l'Egr-1 en fonction du temps et de la dose dans les CMLV A10. Le blocage pharmacologique des tyrosines kinases *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R) et c-Src, par AG1024 et PP2 respectivement, atténue l'expression de l'Egr-1 induite par le H_2O_2 , alors que l'AG1478, un inhibiteur de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR), et le PP3, l'analogue inactif du PP2, n'ont aucun effet sur l'expression de l'Egr-1. Le blocage pharmacologique de l'*extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), par UO126, et de la protéine kinase C (PKC), par rottlerin et rō-31-8220, diminue l'expression de l'Egr-1 induite par le H_2O_2 . En résumé, nos résultats suggèrent que le H_2O_2 déclenche l'expression de l'Egr-1 via l'IGF-1R, la kinase c-Src, l'ERK1/2 et la PKC dans les CMLV.

Mots clés: Egr-1, H_2O_2 , MAPK, ERK1/2, PKC, CMLV

Abstract

Increased generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), plays a key role in the pathophysiology of cardiovascular diseases (CVD). Excessive growth and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) has been suggested as an important contributor of vascular dysfunction. A potential involvement of early growth response protein-1 (Egr-1), a zinc-finger transcription factor, in the development of vascular injury has been proposed. Recent studies have shown that H_2O_2 increases Egr-1 expression in VSMCs. However, signaling events leading to H_2O_2 -induced Egr-1 expression are not fully understood. Therefore, this study aims to examine the signaling pathways implicated in H_2O_2 -induced Egr-1 expression in VSMC. H_2O_2 increased Egr-1 expression in a time and dose-dependent fashion in A10 VSMC. Pharmacological blockade of tyrosine kinases insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and c-Src, by AG1024 and PP2 respectively, attenuated H_2O_2 -induced Egr-1 expression, while AG1478, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, and PP3, the inactive analogue of PP2, have no effect on Egr-1 expression. Pharmacological blockade of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), by UO126, and protein kinase C (PKC), by rottlerin and $\text{r}\ddot{o}$ -31-8220, decreased H_2O_2 -induced Egr-1 expression. In summary, our results suggest that H_2O_2 triggers Egr-1 expression through IGF-1R, c-Src, ERK1/2 and PKC in VSMC.

Key words: Egr-1, H_2O_2 , MAPK, ERK1/2, PKC, VSMC

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	I
Abstract.....	II
Table des matières.....	III
Liste des figures.....	V
Liste des abréviations, sigles et acronymes.....	VIII
Remerciements.....	XII
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Sources endogènes des DRO.....	5
1.2 Métabolisme des DRO.....	6
1.3 Implications du H ₂ O ₂ dans les maladies cardiovasculaires.....	9
1.3.1 Rôle du H ₂ O ₂ dans l'athérosclérose.....	9
1.3.2 Rôle du H ₂ O ₂ dans l'hypertension artérielle.....	10
1.4 Signalisation du H ₂ O ₂ dans le système cardiovasculaire.....	11
1.4.1 Changements induits par le H ₂ O ₂ dans la contraction des CMLV.....	11
1.4.1.1 Implication des kinases de la famille SRC dans la contraction.....	13
1.4.2 Changements induits par le H ₂ O ₂ dans l'hypertrophie, la prolifération et la migration des CMLV.....	15
1.4.2.1 Rôle de l'IGF-1R.....	19
1.4.2.2 Rôle de la PKC.....	20
1.4.2.3 Rôle des kinases de la famille SRC.....	21
1.5 Actions biologiques du H ₂ O ₂ sur les cellules endothéliales.....	24
1.6 Structure de l' <i>Early growth response protein-1</i> (Egr-1).....	24
1.7 Régulation et expression du gène de l'Egr-1.....	27
1.8 Voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'Egr-1 dans les CMLV.....	29

1.9	Implication de l'Egr-1 dans les maladies cardiovasculaires.....	32
1.10	Buts de cette étude.....	34
CHAPITRE 2: ARTICLE.....		35
	<i>Abstract.....</i>	<i>37</i>
	<i>Introduction.....</i>	<i>38</i>
	<i>Materials and Methods.....</i>	<i>40</i>
	<i>Results.....</i>	<i>43</i>
	<i>Discussion.....</i>	<i>46</i>
	<i>References.....</i>	<i>49</i>
	<i>Figure Legends.....</i>	<i>53</i>
CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE.....		64
CHAPITRE 4: CONCLUSION.....		68
CHAPITRE 5: RÉFÉRENCES.....		71
CHAPITRE 6: APPENDICES.....		85

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

- Figure 1.1:** Schéma représentant la paroi vasculaire.....4
- Figure 1.2:** Schéma représentant la génération des DRO ainsi que leur métabolisme.....8
- Figure 1.3** Schéma représentant les différents mécanismes d'activation des kinases de la famille SRC.....14
- Figure 1.4:** Schéma montrant les voies de signalisation induite par la production de H₂O₂ dans les CMLV.....22
- Figure 1.5:** Structure du facteur de transcription Egr-1 et structure de l'élément de réponse EGR sur les gènes cibles de l'Egr-1.....26
- Figure 1.6:** Régions régulatrices du gène humain de l'Egr-1.....28
- Figure 1.7:** Schéma montrant les différentes voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'ET-1 et l'ANGII.....30
- Figure 1.8:** Schéma montrant les différentes voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'IGF-1.....31

CHAPITRE 2: ARTICLE

- Figure 1: Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases early growth response protein-1 (Egr-1) expression in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) in a time and dose-dependent fashion.....56**
- Figure 2: Attenuation of hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced early growth response protein-1 (Egr-1) expression by pharmacological inhibitor AG1024 (IGF-1R-PTK inhibitor) and PP2 (c-Src non-receptor PTK inhibitor) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMCs) in a dose-dependent fashion, but not by pharmacological inhibitor AG1478 (EGFR-PTK inhibitor).....58**
- Figure 3: Reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced early growth response protein-1 (Egr-1) expression by pharmacological inhibitor UO126 (MEK1/2 inhibitor) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) in a dose-dependent fashion.....60**
- Figure 4: Decrease in early growth response protein-1 (Egr-1) expression induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) by pharmacological inhibitors rottlerin and rō-31-8220 (PKC inhibitors) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) in a dose-dependent fashion.....61**
- Figure 5: Inhibition of Egr-1 mRNA level induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) with pharmacological inhibitors AG1024 (IGF-1R-PTK inhibitor), PP2 (c-Src non-receptor PTK inhibitor), UO126 (MEK1/2 inhibitor) and rottlerin (PKC inhibitor) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).....63**

CHAPITRE 4: CONCLUSION

Figure 4.1 : Schéma hypothétique montrant les étapes menant à l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV.....70

CHAPITRE 6: APPENDICES

Figure 6.1: Diminution de l'expression de l'*Early growth response protein-1* (Egr-1) induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par l'inhibiteur pharmacologique SP600123 (inhibiteur de JNK), mais pas par l'inhibiteur pharmacologique SB203580 (inhibiteur de la p38MAPK) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) A10 de façon dose-dépendante.....91

Figure 6.2: Diminution de l'expression de l'*Early growth response protein-1* (Egr-1) induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par les inhibiteurs pharmacologiques SC-66 (inhibiteur de la PKB) et Wortmannin (inhibiteur de la PI3-K) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) A10 de façon dose-dépendante.....93

Figure 6.3: Inhibition de l'expression de l'ARNm d'Egr-1 induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) l'inhibiteur pharmacologique SP600123 (inhibiteur de JNK) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).....95

Liste des abréviations, sigles et acronymes

ADN	acide désoxyribonucléique
ANGII	angiotensine II
AP-1	protéine activatrice-1
ApoE ^{-/-}	knockout apolipoprotéine E
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
BH ₄	tétrahydrobioptérine
Ca ²⁺	calcium
CAMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CuZn-SOD	superoxyde dismutase au cuivre et au zinc
DAG	diacylglycerol
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DPI	<i>diphenyleneiodonium</i>
DRO	dérivés réactifs oxygénés
EBS	<i>Egr-1 binding sequence</i>
EGFR	récepteur du facteur de croissance épidermique
Egr-1	<i>early growth response factor-1</i>
eIF4E	<i>eukaryotic initiation factor-4E</i>
Elk-1	<i>ETS domain-containing protein-1</i>
eNOS	oxyde nitrique synthase endothéliale
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ET-1	endothéline-1

FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GPx	glutathione peroxydase
Grb2	<i>growth factor receptor-boung protein 2</i>
GSK-3	glycogène synthétase kinase-3
GTPase	guanosine triphosphatase
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IGF-1R	<i>insulin-like growth fator-1 receptor</i>
IL-2	interleukine-2
IP ₃	inositol triphosphate
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LDL	lipoprotéine de basse densité
LPA	acide lysophosphatidique
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAPK-2	<i>kinase-activated protein kinase 2</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MCP-1	monocyte chiomioattractant protéine-1
MCV	maladies cardiovasculaires
MLC	chaîne légère de la myosine
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAB 1	<i>nerve growth factor-induced-A-binding proteins 1</i>
NAB 2	<i>nerve growth factor-induced-A-binding proteins 2</i>
NAC	N-acétylcystéine

NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFAT	facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NLS	séquence de localisation nucléaire
NO	oxyde nitrique
NOS	oxyde nitrique synthase
O ₂	oxygène
O ₂ ⁻	anion superoxyde
OH ⁻	anion hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO ⁻	ion peroxinitrite
p70S6K	protéine ribosomique S6 kinase 1
PAK	<i>p21 associated kinase</i>
PPAR γ	récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	récepteur du PDGF
PDK-1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PI3-K	phosphoinositide 3-kinase
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase GMPc dépendante
PLC	phospholipase C
Prx II	péroxirédoxine II
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
PTP	protéines tyrosine phosphatases

Pyk2	proline-riche tyrosine kinase 2
R	domaine répresseur
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
Ref-1	<i>redox factor-1</i>
SAD	<i>strong activation domain</i>
SAPK2	<i>p38/stress-activated protein kinase-2-mediated</i>
Shc	<i>src homology 2 domain</i>
SHR	rats spontanément hypertendus
SOD	superoxyde dismutase
Sos	<i>son of sevenless</i>
SREs	<i>serum response elements</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TGF- β 1	facteur de croissance transformant-bêta 1
TNF- α	facteur de nécrose tumoral alpha
Trx	thiorédoxine
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WAD	<i>weak activation domain</i>
WKY	Wistar Kyoto

Remerciements

Je voudrais remercier mon superviseur D^r Ashok K. Srivastava de m'avoir donné la chance de travailler dans un merveilleux environnement de travail, mais aussi pour sa capacité de m'encourager, son aide ainsi que son amitié. Tout ceci fut excessivement important pour moi pour compléter ce mémoire de maîtrise. Merci beaucoup.

Je voudrais remercier mes collègues Estelle Rolande Simo Cheyou, Paulina Pietruczuk and Viktoria Youreva pour leur aide et leurs conseils tout au long de ce projet. Sans elles, je n'aurais jamais pu avancer aussi rapidement dans mon apprentissage et mes expériences en recherche fondamentale. Merci à toutes et je vous souhaite bonne chance pour le futur.

Je serai toujours reconnaissant envers mes parents et ma sœur pour leur amour, leur support et leur confiance dans tout ce que je désire accomplir dans ma vie. Merci beaucoup.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la cause prédominante de mortalité dans le monde à raison de 31% de la mortalité mondiale (1). Les MCV sont une classe de maladie englobant toute affection reliée au cœur et aux vaisseaux sanguins (1). Il faut savoir que la paroi vasculaire se constitue de trois tuniques; l'intima, la média et l'adventice (Fig 1.1) (2). L'intima est constituée de cellules endothéliales et entre en contact avec le flux sanguin (Fig 1.1). Ces cellules permettent de contrôler la coagulation et la fibrinolyse en plus d'être une barrière semi-sélective entre le sang et les tissus avoisinants (3). L'adventice, quant à elle, se constitue principalement de fibroblastes qui produisent la matrice extracellulaire et des cytokines pour réguler les fonctions vasculaires (4). Malgré le fait que les pathophysiologies menant aux MCV soient très complexes, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) semblent jouer un rôle majeur dans le développement des MCV. Les CMLV, situées au niveau de la média, représentent la principale population cellulaire. Les CMLV possèdent la capacité de réguler le tonus vasculaire et de promouvoir la réparation des vaisseaux sanguins suite à une insulte tissulaire, ce qui démontre leur rôle prédominant dans l'homéostasie cardiovasculaire (5).

Le stress oxydatif, caractérisé par un débalancement où les phénomènes d'oxydation sont supérieurs aux systèmes antioxydants, induit un dysfonctionnement des CMLV au niveau de la croissance cellulaire, de la prolifération cellulaire et de la migration cellulaire (6;7). Un des principaux dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), fut lié aux mécanismes hypertrophiques et contractiles survenant au niveau vasculaire (7). La production intracellulaire de H_2O_2 peut être augmentée par différents peptides vasoactifs tels que l'angiotensine II (ANGII) et

l'endothéline-1 (ET-1), de même que par des hormones de croissance telles que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant-bêta 1 (TGF- β 1) (8;9;10;11). De plus, le H₂O₂ peut diffuser hors des cellules et ainsi affecter les cellules avoisinantes démontrant l'importance de comprendre les effets du H₂O₂ sur les CMLV (12).

Une des réponses cellulaires au stress oxydatif est l'augmentation de l'activité de certains facteurs de transcription tels que l'*Early growth response protein-1* (Egr-1). Egr-1 est un facteur de transcription connu pour sa capacité à promouvoir la croissance cellulaire et le remodelage vasculaire (13). Plusieurs études ont démontré que le H₂O₂ peut promouvoir l'expression de l'Egr-1 dans différents types de cellules vasculaires (14;15). Donc, le H₂O₂ et l'Egr-1 semblent être étroitement liés et ont la possibilité de promouvoir certains événements physiologiques menant au remodelage vasculaire pour ainsi favoriser les MCV. Le remodelage vasculaire est un processus causant des changements structuraux dans la paroi vasculaire. Cela se produit via plusieurs mécanismes tels que la croissance cellulaire, la mort cellulaire, la migration cellulaire et la dégradation de la matrice extracellulaire (16). Le remodelage vasculaire est un déterminant au développement de l'athérosclérose qui s'accompagne de processus inflammatoires impliquant la prolifération et la migration des CMLV vers l'intima et le recrutement et l'infiltration des monocytes au site athérosclérotique, ce qui permet de favoriser le développement des plaques athérosclérotiques (17). Éventuellement, ce processus peut mener à la formation d'un athérome suite à la formation de cellules spumeuses, de matrice extracellulaire et du cap fibreux (17). Tout ceci peut représenter un facteur de risque dans le développement de l'hypertension artérielle. L'hypertension

artérielle se définit comme une condition médicale dans laquelle une pression élevée en permanence peut endommager les vaisseaux sanguins à long terme (18). Une des caractéristiques clés de l'hypertension artérielle est l'augmentation de la résistance périphérique due à la diminution du diamètre des vaisseaux sanguins périphériques (19). Le remodelage vasculaire fait partie intégrante du développement des MCV. Pour mettre tous les événements impliqués en contexte, les sections qui suivent décriront comment le H_2O_2 est produit et comment ce dernier peut déclencher différents événements de signalisation intracellulaire dans les CMLV tandis que la structure, l'expression, le rôle ainsi que l'activation de l'Egr-1 seront décrits dans le but de mettre en évidence comment ces deux éléments peuvent promouvoir les MCV.

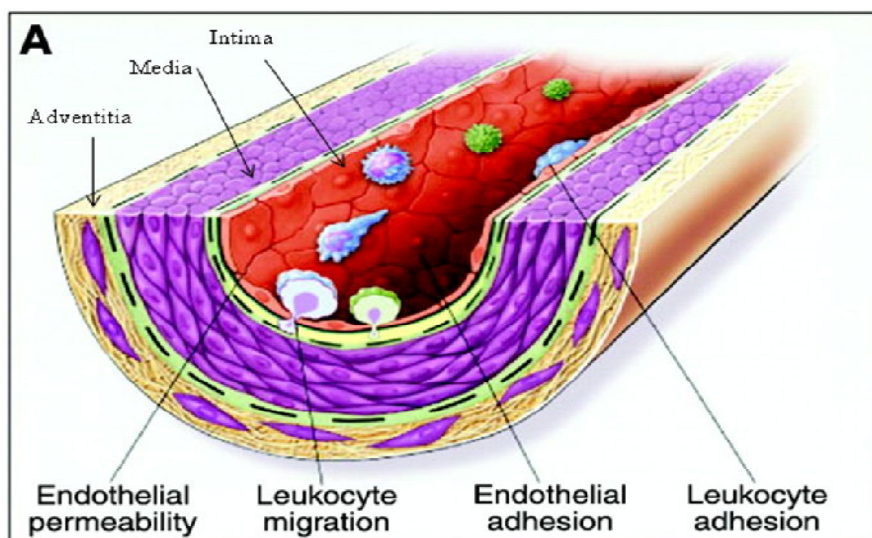


Figure 1.1 Schéma représentant la paroi vasculaire.

L'intima se constitue des cellules endothéliales agissant à titre de barrière entre la lumière du vaisseau sanguin et la paroi vasculaire. La média est composée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) permettant le contrôle du tonus vasculaire. L'adventice (adventitia) possède les fibroblastes régulant différentes fonctions vasculaires. Basée sur la référence (2).

1.1 Sources endogènes des DRO

Les DRO sont le résultat du métabolisme de l'oxygène (O_2) dans la cellule. Les molécules décrites comme des DRO sont l'anion superoxyde (O_2^-), l'anion hydroxyle (OH^-), le H_2O_2 et l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) (20). Les mitochondries sont une des sources principales de DRO puisqu'elles consomment de l' O_2 par le biais de la chaîne respiratoire pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP), ce qui aura comme effet secondaire de produire de l' O_2^- et du H_2O_2 (20). Cependant, l' O_2^- et le H_2O_2 peuvent aussi être produits par une myriade d'enzymes telles que la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAD(P)H) oxydase, la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase, la lipoxigénase, les hèmes oxygénases et les peroxydases, mais ce sont la NAD(P)H oxydase et la xanthine oxydase qui jouent un rôle majeur dans la production de DRO d'origine vasculaire (12). La NAD(P)H oxydase est composée d'un ensemble de sous-unités telles que la p22phox, la p47phox, la p40phox, la p67phox, la gp91phox de même que la guanosine triphosphatase (GTPase) *Ras-related C3 botulinum toxin* (Rac) et les protéines NAD(P)H oxydase (NOX) (8;21;22). Les isoformes NOX1, NOX2 et NOX5, toutes présentes dans le système cardiovasculaire, vont produire principalement de l' O_2^- via la réduction de l' O_2 , à l'exception de l'isoforme NOX4 qui produit majoritairement du H_2O_2 au niveau vasculaire (23). La xanthine oxydase, qui représente la forme oxydée de la xanthine déshydrogénase, produit principalement du H_2O_2 dans des conditions basses en O_2 (24). Malgré tout, plusieurs études tendent à démontrer que la NAD(P)H oxydase représente un élément important dans le développement des MCV. En effet, l'activité de la NAD(P)H oxydase peut être augmentée suite à l'exposition des CMLV à l'ANGII, ce qui engendre une production de l' O_2^- (25). Ce faisant, le rôle des protéines

NOX a été évalué dans plusieurs modèles animaux. Chez des souris déficientes de la sous-unité p47phox croisées avec des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}), on remarque moins de lésions aortiques, renforçant l'hypothèse que la NAD(P)H oxydase soit impliquée dans le développement de l'athérosclérose (26). Chez les rats spontanément hypertendus (SHR), les isoformes NOX1 et NOX2 voient leur expression augmentée simultanément avec l'augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase (27). De plus, chez des souris déficientes de l'isoforme NOX2, on n'observe aucun changement dans la pression systolique suite à un traitement à l'ANGII qui parallèlement est un activateur de l'isoforme NOX2 (28). Il est donc clair que les isoformes NOX1 et NOX2 jouent un rôle prépondérant dans l'hypertension artérielle et l'athérosclérose. Toutes ces informations nous portent à croire que la NAD(P)H oxydase ainsi que les NOX sont au cœur de plusieurs processus menant aux MCV.

1.2 Métabolisme des DRO

La formation des DRO se produit lors d'un ajout d'électron sur une molécule d'O₂ causant la formation de l'O₂⁻ (Figure 1.2). Tel que mentionné précédemment, cette étape peut être catalysée par différentes enzymes telles que la NAD(P)H oxydase et la xanthine oxydase. L'O₂⁻, de par sa haute réactivité ainsi que son potentiel pour endommager les structures cellulaires, est rapidement transformé en H₂O₂, une réaction catalysée par les superoxydes dismutases (SOD) dans les conditions physiologiques (Figure 1.2). Pour prévenir l'accumulation de H₂O₂, ce dernier peut être dégradé en eau par la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) ou la thiorédoxine (Trx). Il est possible que l'O₂⁻ forme l'ion ONOO⁻ dans les conditions pathophysiologiques (Figure 1.2). Lors d'un stress oxydatif, l'oxyde nitrique synthase (NOS) sera découplée et les niveaux de son cofacteur

essentielle à son activité, la tétrahydrobioptérine (BH_4), seront diminués. Ce faisant, la production d'oxyde nitrique (NO) induite par la NOS sera réduite, ce qui poussera le NO à réagir avec O_2^- pour générer l'ion $ONOO^-$ (29). L'ion OH^- est quant à lui produit par la réaction de Fenton comme molécule intermédiaire, mais elle possède des effets limités sur la signalisation intracellulaire (Figure 1.2) (23). Or, s'il y a accumulation excessive d'un de ces DRO suite à l'activation constante des processus oxydatifs, il y aura un déséquilibre entre la génération de DRO et la protection antioxydante menant ainsi à une accumulation de DRO décrivant la présence d'un stress oxydatif (12). Un stress oxydatif chronique causera plusieurs dommages vasculaires venant de l'activation d'événements intracellulaires qui mènent ultimement aux MCV (30).

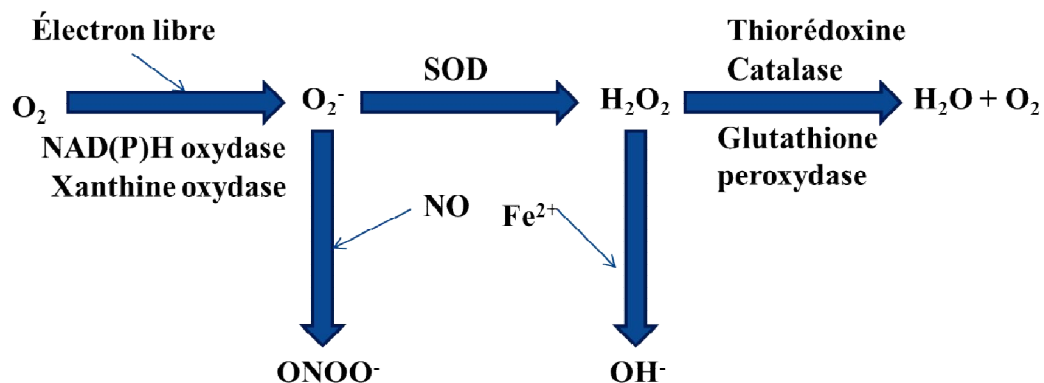


Figure 1.2 Schéma représentant la génération des DRO ainsi que leur métabolisme.

La réduction univalente de l'oxygène (O_2), représentée par l'électron libre, est nécessaire à la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). Ce dernier sera transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 sera par la suite dégradé en eau et en O_2 soit par la thiorédoxine, la catalase ou la glutathion peroxydase. De plus, l'oxyde nitrique (NO) peut produire l'ion peroxynitrite ($ONOO^{\cdot -}$) en présence d'un excès d' $O_2^{\cdot -}$. Le H_2O_2 peut être réduit par la réaction de Fenton où la présence de l'ion Fe^{2+} est requise pour produire l'anion hydroxyle ($OH^{\cdot -}$). Basée sur la référence (9).

1.3 Implications du H₂O₂ dans les maladies cardiovasculaires

1.3.1 Rôle du H₂O₂ dans l'athérosclérose

Au site athérosclérotique, la production du H₂O₂ par les cellules vasculaires déclenche des voies de signalisation promouvant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et le TGF- β 1 (31). Cette affirmation concorde avec les expériences effectuées sur des souris transgéniques surexprimant la catalase au sein de leurs CMLV, où une diminution significative de la présence de ces marqueurs inflammatoires fut observée (31). Par ailleurs, au sein de cette même population de souris, l'infiltration des monocytes fut également diminuée (31). Ces constatations permettent d'affirmer que le H₂O₂ contribue à la progression de l'athérosclérose en contrôlant l'expression des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'infiltration des cellules inflammatoires.

En plus des processus inflammatoires, le rôle important de la peroxydation des lipides au cours du développement de l'athérosclérose a été suggéré. La peroxydation des lipides se définit par un processus dans lequel les radicaux libres attaquent les lipides possédant des double-liens carbone-carbone (32). Les radicaux libres vont détacher l'hydrogène d'un carbone et le remplacer par une molécule d'O₂ menant à une dénaturation des lipides pouvant ultimement mener à l'apoptose cellulaire (32). En tant que radical libre, le H₂O₂ représente un candidat idéal pour favoriser la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides serait donc liée à l'activité du H₂O₂ puisque des études menées sur des souris ApoE^{-/-} soutiennent le fait que le H₂O₂ endogène contribue à la peroxydation des lipides pour promouvoir la formation de plaques athérosclérotiques (33). En fait, il a été démontré que les souris ApoE^{-/-} surexprimant la catalase et/ou la

SOD au cuivre et au zinc (CuZn-SOD) développaient moins de lésions sclérotiques comparativement au groupe de souris ApoE^{-/-} sans surexpression de la catalase et/ou de la CuZn-SOD (33). Cela se voit également dans la peroxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), où celle-ci est diminuée suite à une surexpression de la CuZn-SOD impliquant encore le H₂O₂ dans la peroxydation des lipides (34). De plus, une diminution des niveaux plasmatiques et aortiques d'isoprostane-F₂, un composé formé lors de la peroxydation des acides gras essentiels, entraîne une réduction de la quantité de lipides peroxydés chez les souris ApoE^{-/-} surexprimant la catalase et/ou la CuZn-SOD (34).

1.3.2 Rôle du H₂O₂ dans l'hypertension artérielle

Les DRO dérivés de l'activité de la NAD(P)H oxydase auraient un rôle à jouer dans le développement de l'hypertension puisque des patients souffrant d'hypertension artérielle possède un stress oxydatif augmenté (35). Pour ce qui est du H₂O₂, il peut exercer ses effets pro-hypertensifs en induisant la production de molécules vasoconstrictrices telles que la prostaglandine H₂ et le thromboxane A₂ (36). Ces observations furent réalisées au sein d'aortes dérivant des rats Wistar Kyoto (WKY) et des rats SHR dans lesquelles la vasoconstriction induite par le H₂O₂ fut abolie suite à l'ajout d'indométacine, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, ou de SQ29548, un antagoniste du récepteur de la prostaglandine H₂ et du thromboxane A₂ (36). D'autres études furent menées chez des rats mâles Sprague-Dawley où l'infusion d'ANGII, permettant d'induire l'hypertension chez ces rats, a permis d'observer une augmentation systémique de H₂O₂ (37). Or, l'infusion d'ANGII chez des souris transgéniques surexprimant le gène humain de la catalase ne provoque aucune production de H₂O₂ (38).

Ces études suggèrent que le H₂O₂ joue un rôle dans l'induction de l'hypertension artérielle.

1.4 Signalisation du H₂O₂ dans le système cardiovasculaire

Tel que mentionné ci-dessus, les DRO peuvent favoriser l'avènement des MCV comme c'est le cas dans le développement de l'hypertension artérielle et de l'athérosclérose. Les DRO formés au niveau vasculaire ont la capacité de déclencher une panoplie de voies de signalisation intracellulaire au sein des CMLV en ciblant des tyrosines phosphatases, des tyrosines kinases, des facteurs de transcription et des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (39). L'activation de ces voies de signalisation affectera les CMLV au niveau de leur contraction, de leur survie cellulaire, de leur prolifération et de leur migration. Les effets du H₂O₂ sur ces phénomènes vasculaires seront détaillés dans les sous-sections qui suivent.

1.4.1 Changements induits par le H₂O₂ dans la contraction des CMLV

Les CMLV jouent un rôle prépondérant dans le contrôle du diamètre des vaisseaux sanguins. Par vasoconstriction ou vasodilatation, les CMLV réagissent aux stimuli environnants pour réguler l'apport sanguin aux différents organes. Les DRO sont reconnus pour affecter cette fonction des CMLV. Or, il est intéressant de constater que le H₂O₂ peut promouvoir à la fois la vasodilatation et la vasoconstriction dépendamment du site vasculaire où il agira.

En tant que molécule vasoconstrictrice, le H₂O₂ peut promouvoir la contraction cellulaire des CMLV dérivés de l'aorte thoracique des rats WKY traités avec l'ANGII (40). Suite à un traitement à la catalase, ces CMLV perdent leur contractilité suite à un

blocage de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC), une protéine permettant la contraction des CMLV (40). De plus, des expériences menées sur des aortes provenant de rats mâles Sprague-Dawley révèlent que l'activité de la kinase Rho est augmentée par les DRO (41). La kinase Rho a la capacité d'inhiber la myosine phosphatase, ce qui mène la MLC dans un état de phosphorylation soutenu pour maintenir la contraction des vaisseaux sanguins (41). Tous ces effets peuvent être modulés par la signalisation intracellulaire du calcium (Ca^{2+}) dont les niveaux cytoplasmiques peuvent être augmentés par le H_2O_2 dans les CMLV isolées des rats WKY et des rats SHR (42). Par conséquent, dû à sa capacité à promouvoir l'entrée de Ca^{2+} dans les CMLV, le H_2O_2 stimule l'activité de la kinase Rho et de ce fait prévient la déphosphorylation de la MLC par la myosine phosphatase permettant ainsi de maintenir la contraction des CMLV.

Pour ses actions vasodilatatrices, le H_2O_2 jouera ce rôle principalement comme mécanisme compensatoire dans les artérioles et les vaisseaux sanguins pulmonaires en réponse à une réduction des niveaux de NO (23). Dans ce cas-ci, une déplétion en guanosine monophosphate cyclique (GMPc), liée à la déplétion en NO, va rendre la protéine kinase GMPc-dépendante (PKG) sensible au phénomène d'oxydation avec pour conséquence son activation menant à la synthèse de GMPc pour maintenir les mécanismes vasodilatateurs (43). Dans les artérioles coronaires humaines, le H_2O_2 peut causer la dimérisation de la PKG pour permettre l'ouverture de canaux potassiques à large conductance activés par le Ca^{2+} pour propager un influx hyperpolarisant, donc à effet vasodilatateur (44).

1.4.1.1 Implication des kinases de la famille SRC dans la contraction

Tel que mentionné précédemment, la kinase Rho joue un rôle dans le maintien de la contraction des CMLV en inhibant la myosine phosphatase. Il a été démontré que l'activation de la kinase Rho est étroitement liée aux tyrosines kinases cytosoliques de la famille SRC (45;46). La famille SRC se constitue de neuf membres à part entière, mais trois d'entre eux, c-Src, Fyn et Yes, sont principalement exprimés dans les CMLV (45;46). Le H₂O₂ a la capacité d'agir au niveau de la structure des kinases SRC pour promouvoir leur activité dans les CMLV (47). L'activation des kinases SRC nécessite la déphosphorylation du domaine auto-inhibiteur phospho-tyrosine en C-terminal ainsi que l'auto-phosphorylation de la sous-unité catalytique (Fig 1.3) (48). De plus, le H₂O₂ possède trois autres mécanismes permettant l'activation des kinases SRC. L'un des mécanismes est l'inhibition du domaine SRC spécifique aux protéines tyrosine phosphatases (PTP) et du domaine C-terminal (49;50). Cela aura pour effet d'empêcher la déphosphorylation de la sous-unité catalytique et la phosphorylation du domaine auto-inhibiteur phospho-tyrosine respectivement pour que SRC reste active. Les deux autres mécanismes permettent de suractiver les kinases SRC. L'un favorise la formation de ponts disulfures sur la forme inactivée de SRC tandis que l'autre consiste en l'oxydation des cystéines 245 et 487 sur la forme activée de SRC (Fig 1.3) (51;52). En plus d'être liée à la kinase Rho, la famille SRC peut favoriser l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant soit en les phosphorylant directement, soit en ouvrant les canaux Na⁺-Ca²⁺ engendrant ainsi un influx dépolarisant pouvant ouvrir ces canaux calciques (53). L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire aura pour effet la phosphorylation de la MLC pour induire la contraction des CMLV. Ce faisant, la famille SRC représente un acteur non-négligeable au niveau de la contraction vasculaire.

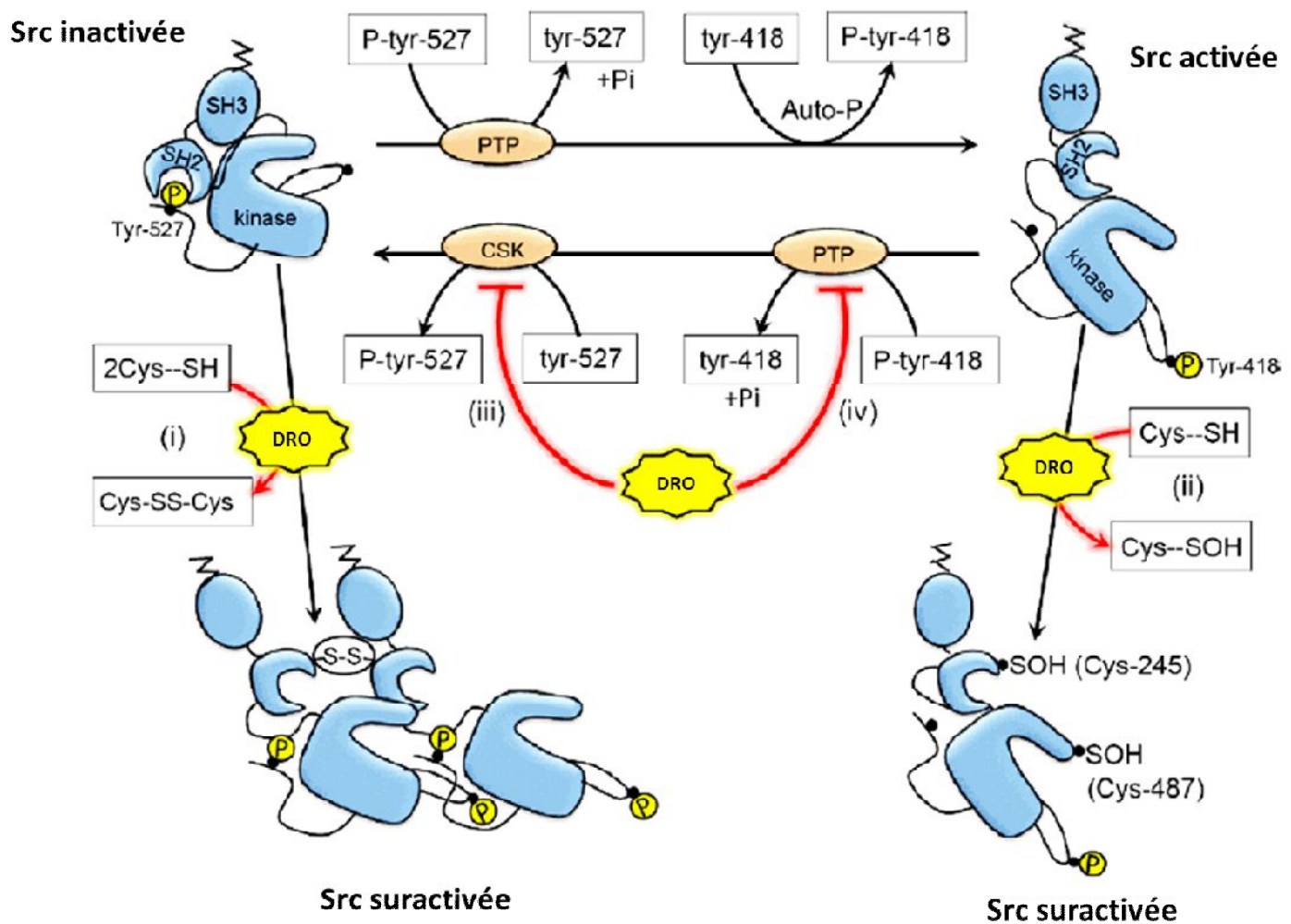


Figure 1.3 Schéma représentant les différents mécanismes d'activation des kinases de la famille SRC. La déphosphorylation de la Tyr 527 ainsi que la phosphorylation de la Tyr 418 permettent l'activation de SRC. Les DRO peuvent garder SRC active en inhibant (iii) le domaine inhibiteur c-Src kinase (CSK) et (iv) le domaine c-Src protéines tyrosine phosphatases (PTP). Les DRO peuvent également suractiver SRC soit en créant (i) des ponts disulfures sur la forme inactivée de SRC ou soit en oxydant (ii) des résidus cystéines sur la forme activée. À noter que les acides aminés représentés sont ceux du gène humain c-Src. Basée sur les références (50;51;52).

1.4.2 Changements induits par le H₂O₂ dans l'hypertrophie, la prolifération et la migration des CMLV

L'hypertrophie est un phénomène caractérisé par l'augmentation en volume d'une cellule. Celle-ci devient pathologique lorsque les cellules subissent un stress chronique. Cela peut se produire lors de stress oxydatif au niveau des CMLV. Tel que mentionné précédemment, il existe plusieurs peptides vasoactifs qui ont la capacité d'activer la NAD(P)H oxydase suite à leur liaison sur leur récepteur. Ce faisant, ils peuvent augmenter la production des DRO et ainsi favoriser les voies de signalisation liées aux DRO. Un exemple connu est l'hypertrophie induite par l'ANGII (Fig 1.4A). Effectivement, l'hypertrophie induite par l'ANGII peut être inhibée par le *diphenyleneiodonium* (DPI), un inhibiteur de la NAD(P)H oxydase, ainsi que par la catalase pour démontrer l'implication du H₂O₂ dans l'hypertrophie des CMLV (54). La production de H₂O₂ induite par l'ANGII peut donc promouvoir l'hypertrophie des CMLV. Dans les effets de l'ANGII dépendants du H₂O₂, la tyrosine kinase c-Src sera activée (55). c-Src va former un complexe avec la proline-riche tyrosine kinase 2 (Pyk2) pour promouvoir la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et l'activation de *c-Abelson murine leukemia viral oncogene* (c-Abl) (56). Cela mènera à la création de sites de liaison pour certaines molécules telles que l'adaptateur p130Cas qui peut déclencher l'activation de la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) (57). L'activation de la PI3-K active la *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK-1) pour promouvoir la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB) (58). Parallèlement à ces événements, le H₂O₂ va oxyder la Trx pour la libérer de l'*apoptosis regulating kinase-1* (ASK-1) et lui permettre de se lier à la p38 MAPK (59). La p38

MAPK, qui a précédemment été activée par une augmentation de l'activité de Ras suite à une production de DRO dépendante des NOX, va recruter la *MAPK-activated protein kinase-2* (MAPKAPK-2) pour former un complexe composé d'ASK-1, de la p38 MAPK et de la MAPKAPK-2 permettant une activation complète de la PKB (60;61). La PKB sera maintenant en mesure de phosphoryler la Ser 65 de la protéine PHAS-1, une protéine pouvant réguler la phase d'initiation de la transduction (62). Il est important de mentionner que PHAS-1 a également besoin d'être phosphorylée sur sa Thr 70 pour être complètement activée (62). Cette phosphorylation sera réalisée par un mécanisme indépendant des DRO qui inclue la voie de signalisation de l'*extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2) (62). Le récepteur de type 1 de l'ANGII active la phospholipase C (PLC) via les protéines G (63). La PLC augmente la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et permet la transactivation de l'EGFR (64). Les protéines *src homology 2 domain* (Shc), *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) et *son of sevenless* (SOS) vont s'associer pour favoriser l'activation de la cascade Ras et Raf (64). Ces dernières vont activer ERK1/2 pour qu'elle puisse ainsi phosphoryler la Thr 70 de PHAS-1 (64). La phosphorylation de PHAS-1 va causer la libération de l'*eukaryotic initiation factor-4E* (eIF4E), une protéine responsable de l'initiation de la transduction de l'ARN messenger (ARNm) (65). Le H_2O_2 a aussi le potentiel de contribuer à l'hypertrophie en influençant les canaux calciques ainsi que les pompes à Ca^{2+} (66). En effet, le H_2O_2 régule l'activité du récepteur à la ryanodine qui médie la contraction musculaire par sa capacité à induire la libération du Ca^{2+} entreposé dans le réticulum sarcoplasmique (66). Le H_2O_2 augmente la probabilité d'ouverture de ce récepteur causant ainsi une augmentation du niveau de Ca^{2+} cytosolique (66). De plus, la

sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, une Ca²⁺ ATPase destinée à importer du Ca²⁺ cytosolique vers la lumière du réticulum sarcoplasmique, peut être inactivée par oxydation gardant ainsi le niveau cytosolique de Ca²⁺ élevé pour favoriser le remodelage et l'hypertrophie cellulaire (67). Des niveaux élevés de Ca²⁺ vont activer la calmoduline et son substrat, la calcineurine (68). La calcineurine a pour effet de déphosphoryler le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), le rendant apte à se transporter vers le noyau pour promouvoir la transcription des gènes en lien avec l'hypertrophie cellulaire (68).

Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) peut également agir sur les CMLV via la production de DRO (Fig 1.4B). Or, contrairement à l'ANGII, le PDGF induira la prolifération des CMLV, un mécanisme augmentant le nombre de CMLV présent dans les vaisseaux sanguins. Une prolifération trop importante des CMLV risque de détériorer la fonction vasculaire puisque les CMLV en état de prolifération constante perdent leurs propriétés contractiles. Le PDGF a grandement été étudié dans les CMLV de par ses actions médiées par son récepteur (PDGFR). L'implication du H₂O₂ dans les voies de signalisation induites par le PDGF a été suggérée en observant que la peroxyrédoxine II (Prx II), une peroxydase qui élimine le H₂O₂ endogène, diminue la signalisation du PDGF (69). De plus, une déficience en Prx II contribue à augmenter les niveaux de H₂O₂ et l'activation du PDGFR suggérant que le H₂O₂ peut affecter la signalisation du PDGF (69). Tel que mentionné ci-haut, ERK1/2 sera activé et pourra se déplacer vers le noyau pour activer l'*activator protein 1* (AP-1) et le changement conséquent dans l'activité du *redox factor-1* (Ref-1) qui inhibe la Trx (70). Cette dernière

étape engendre une augmentation de l'expression des gènes liés à la croissance dans les CMLV.

La prolifération cellulaire peut aussi être associée à une progression du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire permet à la cellule mère de se diviser selon plusieurs étapes précises pour s'assurer que l'acide désoxyribonucléique (ADN) soit dupliqué aux deux cellules filles. En ce qui concerne le cycle cellulaire, de faibles niveaux de DRO sont reconnus pour promouvoir la croissance cellulaire tandis que des niveaux élevés de DRO mènent à l'apoptose (71). Le H_2O_2 peut inactiver la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), un mécanisme que le PDGF utilise pour augmenter la quantité de phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) (71). Le PIP3 active la PKB qui à son tour va pouvoir activer le *mammalian target of rapamycin* (mTOR) et inhiber la glycogène synthétase kinase-3 (GSK-3) (71;72). D'une part, mTOR engendre l'activation de la protéine ribosomique S6 kinase 1 (p70S6K) pour accroître la synthèse de la cycline D1 pour faire progresser les CMLV dans leur cycle cellulaire (72). D'autre part, l'inactivation de la GSK-3 va prévenir la phosphorylation de la cycline D1, mécanisme permettant d'empêcher la dégradation de la cycline D1 induite par la GSK-3 pour s'assurer que le cycle cellulaire ne soit pas à l'arrêt complet (72). Bref, la PKB cible deux molécules clés pour s'assurer que les CMLV continuent à progresser dans leur cycle cellulaire.

La migration des CMLV est l'un des mécanismes à la base du remodelage vasculaire, car elle permet l'épaississement de l'intima et le durcissement conséquent de la paroi vasculaire. L'extension de la membrane cellulaire constitue le point de départ de la migration cellulaire. Cette étape se produit lors d'un dommage vasculaire créant un

changement de polarité dans la cellule engendrant ainsi la migration des CMLV vers la lumière des vaisseaux sanguins (73). L'extension de la membrane cellulaire est rendue possible grâce à la polymérisation de l'actine, où l'on observe l'incorporation de monomères d'actine pour permettre à la membrane de s'étendre. La migration cellulaire peut être induite par les DRO via la phényléphrine, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et la chémokine monocyte chimioattractant protéine-1 (MCP-1) (74;75;76). Il a effectivement été démontré que la migration induite par la phényléphrine et le VEGF est inhibée par la catalase et la N-acétylcystéine (NAC) tandis que la migration induite par la MCP-1 est inhibée par la SOD (74;75;76).

1.4.2.1 Rôle de l'IGF-1R

Plusieurs facteurs hypertrophiques, tels que l'ANGII, le PDGF et les DRO, sont en mesure d'influencer l'expression de l'*insulin-like growth factor receptor 1* (IGF-1R), un récepteur tyrosine kinase reconnu comme étant critique dans la croissance des CMLV (77;78;79;80). Ce récepteur se constitue de deux chaînes alpha extracellulaires et de deux chaînes bêta intracellulaires (81). Son activation cause l'auto-phosphorylation des tyrosines présentes sur les chaînes bêta pour engendrer la phosphorylation des *insulin receptor substrate* (IRS) et de *Src homology domain 2* (Shc) (82). Ce sont les IRS qui permettent la transduction du signal vers la PI3-K et les MAPK pour favoriser la croissance et la différenciation des CMLV (83;84). L'IGF-1R va lier principalement l'IGF-1 pour exercer ses effets biologiques. Or, le H₂O₂ est reconnu pour activer l'IGF-1R. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'IGF-1R inhibe les effets du H₂O₂ sur la PKB (85). Bref, le H₂O₂ aurait la possibilité de médier certains de ces effets hypertrophiques via l'IGF-1R.

1.4.2.2 Rôle de la PKC

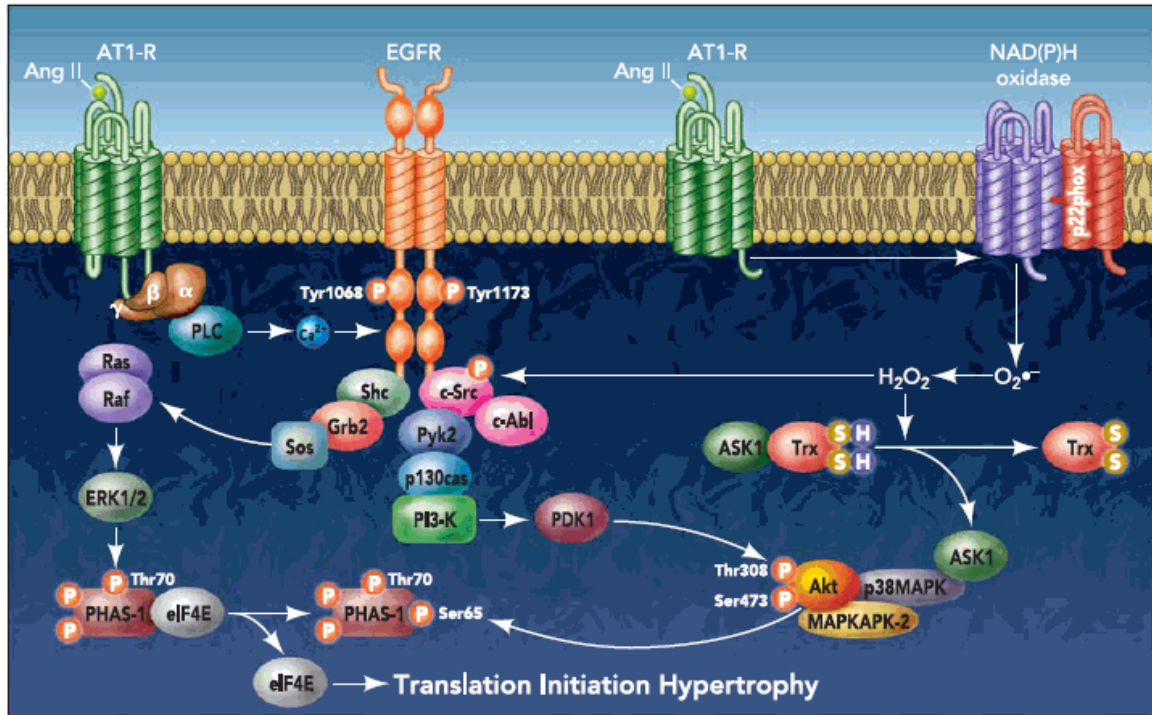
Il est connu que l'hypertrophie induite par activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est médiée par les protéines kinases C (PKC). En effet, les PKC peuvent causer l'hypertrophie en réponse à l'ANGII et à l'ET-1 (86;87). De plus, les PKC peuvent réguler l'hypertrophie via l'ERK1/2, une MAPK grandement impliquée dans ce phénomène pathophysiologique (88). La PKC représente une classe de kinase constituée de différentes familles pouvant promouvoir certaines MCV (89;90). Elle se compose de plusieurs isoformes toutes classées en sous-catégories selon leur molécule stimulatrice. Celles pouvant répondre au Ca^{2+} , au diacylglycérol (DAG) et aux phospholipides sont dites conventionnelles (isoformes α , β et γ). Lorsqu'elles ne peuvent répondre qu'au DAG, elles sont décrites comme étant « nouvelles » (isoformes θ , δ , ϵ et η). Finalement, celles ne répondant ni au Ca^{2+} ni au DAG, mais à la phosphatidylsérine, sont dites atypiques (isoformes ι et ζ) (91). Chaque isoforme est capable de causer différentes réponses cellulaires selon la situation physiologique. Les isoformes PKC α , PKC β et PKC ϵ sont toutes augmentées en situation d'hypertrophie cardiaque (92;93). Les PKC peuvent être affectées par des processus de modifications redox. C'est au niveau du domaine régulateur N-terminal et du domaine catalytique que le H_2O_2 peut agir directement sur les PKC. En effet, ces deux domaines possèdent des résidus cystéines susceptibles d'être modifiés par le H_2O_2 (94). Ceci démontre que les PKC jouent un rôle important dans la régulation de l'hypertrophie.

1.4.2.3 Rôle de la famille SRC

Les kinases SRC peuvent également jouer un rôle dans la migration cellulaire via leur activation par les DRO (52). En effet, les kinases SRC peuvent cibler plusieurs protéines en lien avec la migration cellulaire, telles que la paxilline, l'adaptateur p130Cas et la *focal adhesion kinase* (FAK) (95;52). La production de H₂O₂ favorise la polymérisation de l'actine via la phosphorylation de c-Src (96). Cette dernière peut augmenter l'activité de la PDK-1 et ainsi mener à l'activation de la *p21 associated kinase* (PAK) et ainsi favoriser l'incorporation des monomères d'actine (96). La famille SRC est donc un groupe de kinase pouvant faciliter la motilité des CMLV en présence de H₂O₂ de par ses effets sur la polymérisation de l'actine.

Figure 1.4

A.



B.

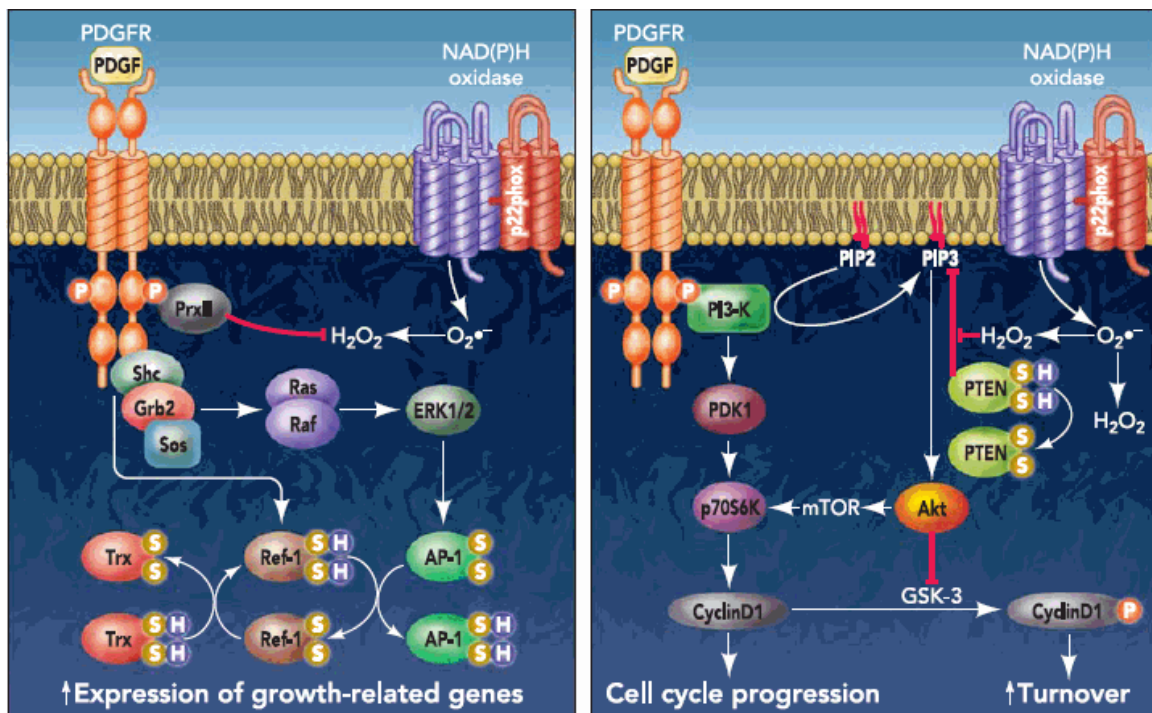


Figure 1.4 Schéma montrant les voies de signalisation induite par la production de H₂O₂ dans les CMLV. A. Représentation des voies dépendantes et indépendantes des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Ces deux voies sont activées lors de l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) induite par l'angiotensine II (ANGII). La voie indépendante des DRO est activée via une protéine Gq menant à une augmentation du niveau de Ca²⁺ cytosolique induite par la phospholipase C (PLC) pour promouvoir la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). L'association entre les protéines *src homology 2 domain* (Shc), *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) et *son of sevenless* (SOS) va activer la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) pour ainsi promouvoir la phosphorylation de la Thr 70 de PHAS-1 induite par l'*extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2). La voie dépendante des DRO, par le biais de la production de H₂O₂, aura deux effets. D'une part, la tyrosine kinase cytosolique c-Src et la proline-riche tyrosine kinase 2 (Pyk2) vont promouvoir la phosphorylation de *c-Abelson murine leukemia viral oncogene* (c-Abl) et de l'EGFR pour favoriser leur association avec l'adaptateur p130Cas et la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) pour ultimement activer la *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK-1). D'autre part, le H₂O₂ va oxyder la thiorédoxine (Trx) pour libérer l'*apoptosis signal regulating kinase-1* (ASK-1). La PDK-1 va activer la protéine kinase B (PKB) tandis que l'ASK-1 va se lier à la p38 MAPK pour promouvoir le recrutement de la *MAPK-activated protein kinase-2* (MAPKAPK-2). La MAPKAPK-2 mène à l'activation complète de la PKB pour qu'elle puisse induire la phosphorylation de la Ser 65 de PHAS-1. Ces deux phosphorylations permettront de dissocier PHAS-1 et l'*eukaryotic initiation factor-4E* (eIF4E) pour accroître l'hypertrophie. **B.** L'activation du PDGFR par le PDGF permet d'agir sur le cycle cellulaire et l'expression de gènes liés à la prolifération cellulaire. Au niveau du cycle cellulaire, le H₂O₂ peut empêcher l'inhibition de *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) pour que le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) produit par la PI3-K garde la PKB active. Cette dernière activera le *mammalian target of rapamycin* (mTOR) et inhibera la glycogène synthétase kinase-3 (GSK-3). mTOR causera l'activation de la protéine ribosomique S6 kinase 1 (p70S6K) pour favoriser l'activité de la cycline D1 tandis que l'inhibition de la GSK-3 l'empêchera d'inactiver la cycline D1. Ce faisant, les CMLV pourront progresser dans leur cycle cellulaire. La cascade favorisant la prolifération cellulaire implique l'activation de l'ERK1/2 telle que mentionnée ci-dessus. Or, ERK1/2 activera l'AP-1 pour que cette dernière puisse modifier l'activité du *redox factor-1* (Ref-1) pour qu'il puisse inhiber la Trx. Cela causera une augmentation de l'expression des gènes liés à la prolifération cellulaire. Basée sur la référence (69).

1.5 Actions biologiques du H₂O₂ sur les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales modulent la physiologie des CMLV par la production de diverses substances capables d'induire entre autres la dilatation des CMLV. Le métabolisme du NO est la principale cible de l'action du H₂O₂ sur la fonction endothéliale. Le H₂O₂ peut promouvoir le découplage de la NOS endothéliale (eNOS), ce qui augmente les niveaux d'O₂⁻, diminuant ainsi la biodisponibilité du NO (97). De plus, le H₂O₂ peut augmenter l'expression de l'arginase dans l'endothélium des artérioles coronaires (98). Étant donné que l'arginase métabolise la L-arginine en urée et en L-ornithine, la biodisponibilité de la L-arginine sera réduite, menant à une diminution de la production de NO puisque la L-arginine est un précurseur du NO (98). Une diminution du niveau de NO détériore le processus de vasodilatation des cellules endothéliales, ce qui peut prédisposer à l'athérosclérose (98).

1.6 Structure de l'*Early growth response protein-1* (Egr-1)

L'Egr-1 fut la première protéine décrite à titre de facteur de transcription à doigt de zinc (99). Au moment de sa découverte, elle fut également décrite comme étant un facteur de croissance neuronal (99). Cette protéine fut nommée Egr-1 de par sa capacité à favoriser la croissance chez les fibroblastes, les cellules épithéliales et les lymphocytes (100). Localisée sur le chromosome 5q23-q31, la protéine Egr-1 mature est constituée de 533 acides aminés et possède un poids moléculaire de 80 kDa. Les domaines fonctionnels présents sur l'Egr-1 permettent de contrôler son activité transcriptionnelle (Fig 1.5). Le *DNA-binding domain* (DBD) est composé de trois motifs à doigt de zinc et se localise entre les acides aminés des positions 332 à 416 (101). À même le DBD, une séquence de

localisation nucléaire (NLS) de 15 acides aminés est présente en position N-terminal de ce domaine (102). Des études structurales ont révélé la présence d'un *strong activation domain* (SAD) dans la région N-terminale de l'Egr-1 ainsi qu'un *weak activation domain* (WAD) dans sa région C-terminale (103). Finalement, un domaine répresseur (R) composé de 34 acides aminés se trouve entre les domaines SAD et NLS (104). Ce domaine régulateur sert de site de liaison pour les protéines *nerve growth factor-induced-A-binding proteins 1 and 2* (NAB1 et NAB2), deux protéines répressives d'Egr-1 (104;105). L'Egr-1 utilise son motif à doigt de zinc pour lier la séquence d'ADN 5'-GCGGGGCG-3', nommée *Egr-1 binding sequence* (EBS), présente sur le promoteur de ses gènes cibles pour modifier l'expression (106;107).

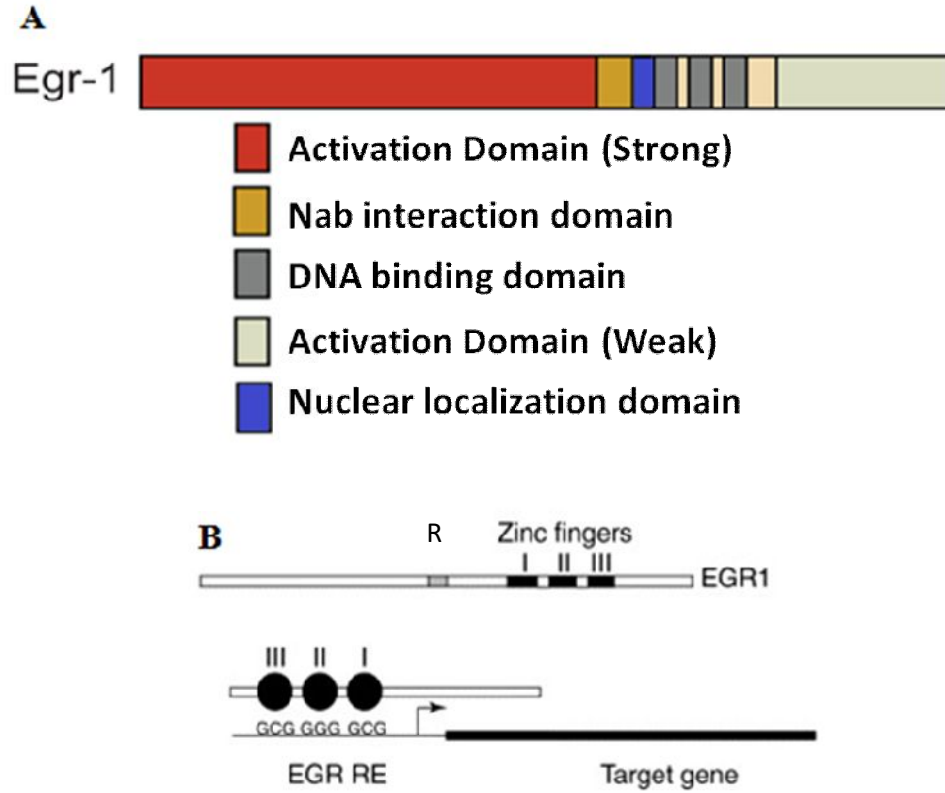


Figure 1.5 Structure du facteur de transcription Egr-1 et structure de l'élément de réponse EGR sur les gènes cibles de l'Egr-1. A. Représentation schématique du gène de l'Egr-1. L'Egr-1 se compose de cinq domaines indépendants; un *strong activation domain* (SAD) favorisant l'activité de l'Egr-1, un domaine répresseur (R), un site de localisation nucléaire (NLS), un *DNA-binding domain* (DBD) contenant trois motifs doigt de zinc et un *weak activation domain* (WAD). **B.** Représentation schématique des gènes cibles de l'Egr-1 ayant un élément de réponse EGR. À noter que les zones de couleur beige représentent différents sites pouvant subir des modifications post-transcriptionnelles. Basée sur les références (108) et (109).

1.7 Régulation et expression du gène de l'Egr-1

L'Egr-1 possède des *serum response elements* (SRE) au niveau de sa région 5' (Fig 1.6) (105). L'activation des SRE requiert la présence du *serum response factor* (SRF) et du complexe ternaire, ce dernier étant composé de l'*ETS domain-containing protein-1* (Elk-1) et des protéines accessoires SRF 1 et 2, dans le but de déclencher les activités biologiques des gènes cibles de l'Egr-1 (105). Un *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) *response element-binding protein* (CREB) dans la structure du promoteur de l'Egr-1 permet de contrôler sa transcription via la *p38/stress-activated protein kinase-2-mediated* (SAPK2) (110;111) (Fig 1.6). La région EBS présente sur l'Egr-1 permet de réguler sa propre transcription génique (107). Finalement, l'Egr-1 possède deux sites de liaison pour la protéine activatrice Sp1 (Fig 1.6). Il a été démontré que l'Egr-1 peut déloger la Sp1 de ses gènes cibles pour retirer l'effet d'inhibition causé par la Sp1 favorisant donc la transcription des gènes cibles de l'Egr-1 (112). Comme cela fut démontré pour la région EBS, il est possible que l'Egr-1 lie sa propre région Sp1 pour augmenter davantage sa propre transcription. Il est intéressant de mentionner que l'Elk-1 est une protéine capable de phosphoryler l'ERK1/2 et la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) pour promouvoir les liaisons d'ADN, la formation du complexe ternaire et la transcription des SRE (113). De plus, l'activateur de l'ERK1/2, la *mitogen-activated protein kinase kinase 1/2* (MEK1/2) est en mesure de stimuler l'activité du promoteur de l'Egr-1 (114). Donc, l'Elk-1 permet de relier la voie de signalisation de l'ERK1/2 à l'activation de la transcription de l'Egr-1 (115).

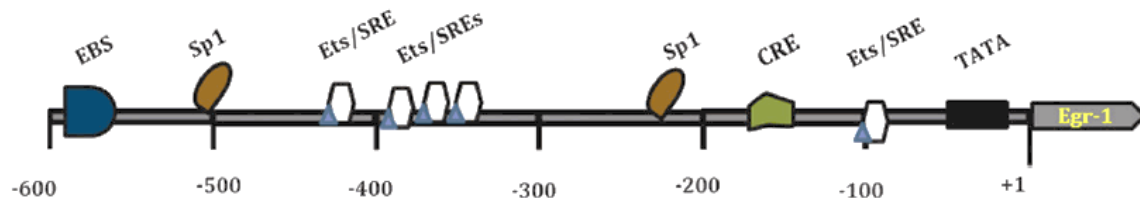


Figure 1.6 Régions régulatrices du gène humain de l'Egr-1. La flèche indique le lieu de départ de la transcription de l'Egr-1. La région 5' contient une boîte TATA, des *serum-response elements* (SRE), un *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) *response element-binding protein* (CREB) et deux sites de liaison pour Sp1. De plus, l'Egr-1 lie son propre promoteur via les sites *Egr-1 binding sequence* (EBS). Basée sur la référence (115).

1.8 Voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'Egr-1 dans les CMLV

Certaines études effectuées sur la signalisation de l'Egr-1 ces dernières années tentent d'identifier son rôle dans le système cardiovasculaire. Dans les CMLV, plusieurs études démontrent un lien entre les voies de signalisation induisant la prolifération cellulaire et l'induction de l'expression de l'Egr-1. La signalisation du Ca^{2+} joue un rôle dans le déclenchement de l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV (Fig 1.7) (116). En fait, l'expression de l'Egr-1 induite par l'ET-1 est atténuée par différents inhibiteurs pharmacologiques ciblant la signalisation calcique tels que le calmidazolium et le W-7, deux inhibiteurs de la calmodulin, et le KN-93, un inhibiteur de la *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II* (CAMKII) (Fig 1.7) (116). Les voies de signalisation d'ERK1/2 et de JNK sont également impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'acide lysophosphatidique (LPA) et l'ANGII démontrant l'importance des MAPK dans l'expression de l'Egr-1 (117;118). Les voies de signalisation de la PI3-K et de la PKB activées par l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) peuvent favoriser l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV (Fig 1.8) (119). De plus, il est intéressant de constater que la production de DRO, suite à l'exposition des CMLV à l'IGF-1, affecte l'expression de l'Egr-1, ce qui fut démontré grâce à l'utilisation du DPI comme inhibiteur de la NAD(P)H oxydase (Fig 1.8) (119). Ainsi, les DRO font partie intégrante de la signalisation intracellulaire modulant l'expression de l'Egr-1. Cependant, les voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'Egr-1 par le H_2O_2 restent encore à être élucidées.

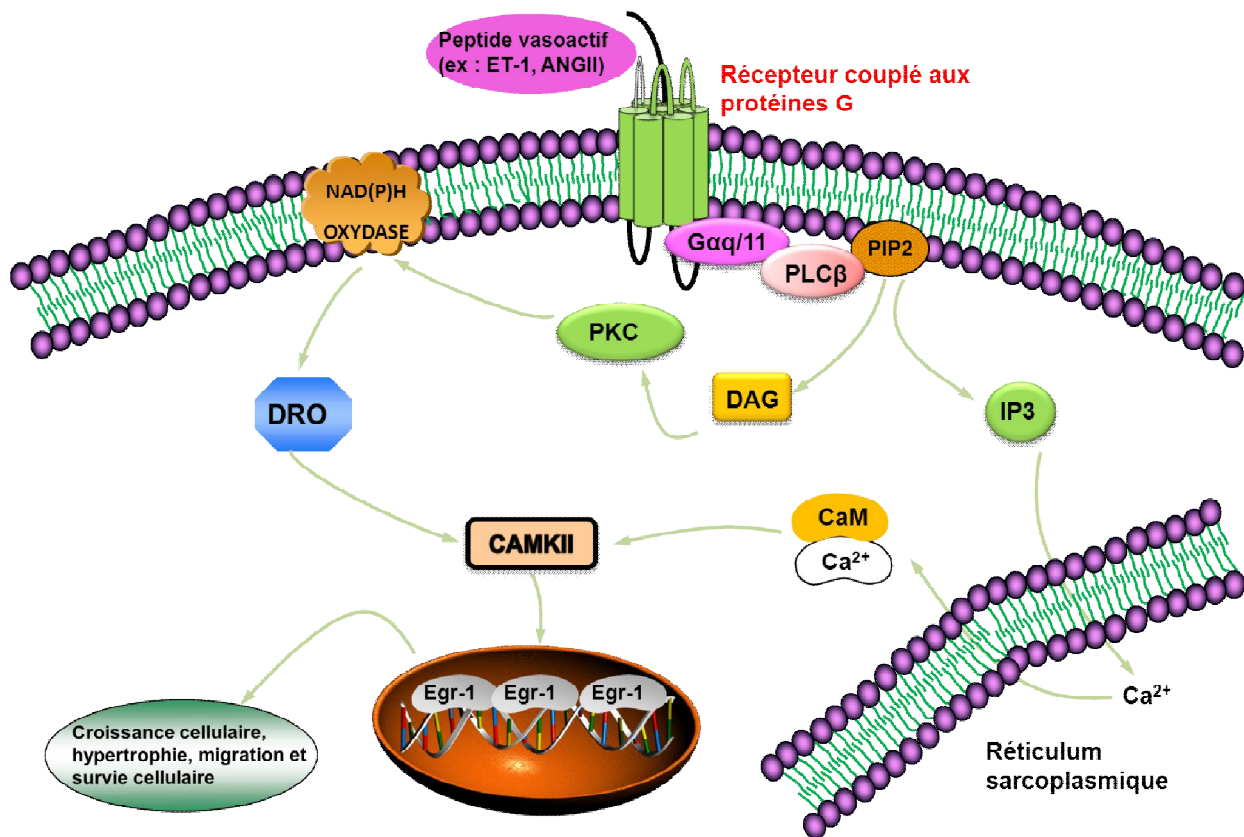


Figure 1.7. Schéma montrant les différentes voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'ET-1 et l'ANGII. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) activés par des peptides vasoactifs vont causer l'arrivée de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol en présence d'inositol triphosphate (IP₃). Le DAG aura pour effet d'activer la PKC pour favoriser la production des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). La présence de Ca²⁺ et de DRO va favoriser l'activation de la Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII) pour éventuellement hausser l'expression de l'Egr-1 et ainsi promouvoir la croissance cellulaire, l'hypertrophie cellulaire, la migration cellulaire ainsi que la survie cellulaire. Basée sur la référence (116).

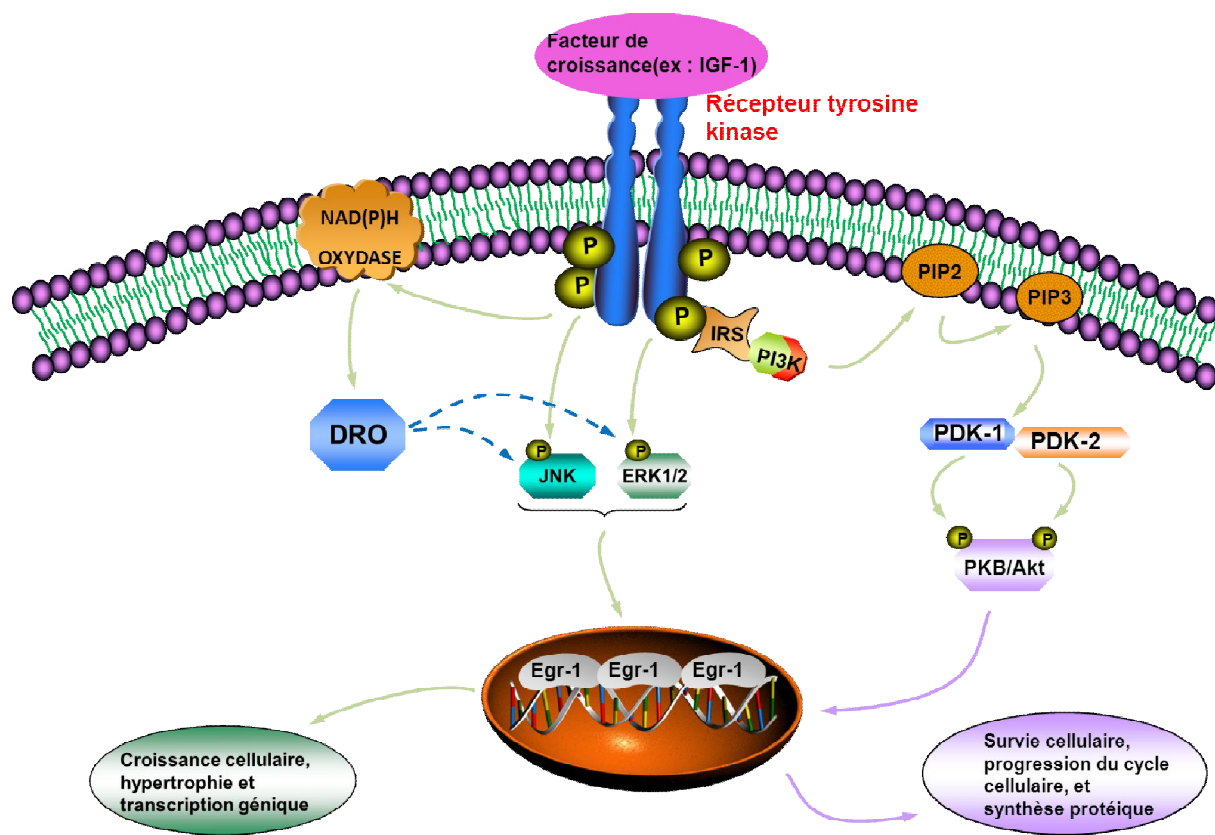


Figure 1.8. Schéma montrant les différentes voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par l'IGF-1. L'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) active l'*insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R). Cela cause l'augmentation de la production des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) ainsi que la phosphorylation de la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et de l'*extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2). Ces dernières sont dépendantes de la production de DRO et vont favoriser la croissance et l'hypertrophie cellulaires via l'activation de l'*Early growth response protein-1* (Egr-1). Également, la voie de signalisation de la protéine kinase B (PKB) sera déclenchée via l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) induite par l'IGF-1R pour promouvoir la survie cellulaire et la synthèse protéique via l'expression de l'Egr-1. Basée sur la référence (119).

1.9 Implication de l'Egr-1 dans les maladies cardiovasculaires

L'Egr-1 est faiblement exprimé dans les vaisseaux sanguins sains. En présence de stimuli liés au stress, l'expression de l'Egr-1 est augmentée. En fait, l'Egr-1 est un médiateur des effets de certaines molécules clés impliquées dans le remodelage vasculaire, telles que le PDGF, le récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases gamma (PPAR γ) et le TGF- β 1 (120;121;122).

L'enzyme ED5, capable de cliver l'ARNm de l'Egr-1, est grandement utilisée pour démontrer le rôle de l'Egr-1 dans diverses situations pathologiques (123). Cette molécule fut utilisée pour démontrer les rôles de l'Egr-1 dans les désordres vasculaires suite à des greffes veineuses (124;125). En effet, l'élimination de l'Egr-1 par cette méthode réduit la sténose et la formation de néointima qui peuvent être observées lors de greffes veineuses (124;125). Des études ayant démontré un rôle majeur de l'Egr-1 dans le remodelage systémique artériel suggèrent que l'Egr-1 favorise le développement néointimal dans l'hypertension artérielle pulmonaire (126). La diminution de l'Egr-1 induite par l'enzyme ED5 ou bien par des méthodes pharmacologiques démontrent une atténuation du remodelage vasculaire pulmonaire *in vivo* indiquant le rôle critique de l'Egr-1 dans l'hypertension artérielle pulmonaire (126).

Par ailleurs, le rôle fonctionnel de l'Egr-1 fut démontré en observant les niveaux du PDGF et du TGF- β 1 (127). Ces derniers sont augmentés lors de l'hypertension artérielle pulmonaire, mais suite à une inhibition de l'Egr-1, on observe une diminution des niveaux de PDGF et du TGF- β 1 démontrant le rôle de l'Egr-1 dans la régulation de ces deux facteurs de prolifération cellulaire (127).

De plus, les stades précoces du développement de lésions athérosclérotiques s'accompagnent d'une augmentation de l'expression des gènes cibles d'Egr-1, notamment le TNF- α et l'interleukine-2 (IL-2) (127). Aussi, dans un modèle de souris déficientes du récepteur LDL recevant une diète riche en gras, l'hypercholestérolémie consécutive s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'Egr-1 dans les CMLV (128). Des observations similaires furent observées chez les souris ApoE^{-/-} démontrant ainsi un rôle prépondérant de l'Egr-1 dans le processus de l'athérogénèse chez les souris et les humains (128).

Les PKC semblent également avoir un rôle important dans l'athérosclérose liée à l'Egr-1 puisque des études *in vivo* chez des souris déficientes en PKC β ne montrent aucun signe d'athérosclérose (129).

Mis à part l'hypertension et l'athérosclérose, l'Egr-1 peut aussi être lié à la resténose et à l'ischémie. Chez des souris déficientes en Egr-1 assujetties à l'hypoxie, les niveaux d'expression du facteur tissulaire et les dépôts de fibrine, caractéristiques représentatives des modèles d'ischémie et de reperfusion, sont atténués au niveau pulmonaire comparativement aux souris sauvages (130). Cet effet est aussi observé chez les souris déficientes de la PKC β ainsi que dans les blocages pharmacologiques de la PKC β suggérant qu'elle soit importante dans l'activation de l'Egr-1 (131).

1.10 Buts de cette étude

En tant que DRO le plus stable dans le système vasculaire, le H₂O₂ est impliqué dans la pathophysiologie des maladies vasculaires via l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans les processus d'inflammation, de migration, de prolifération et de survie cellulaires.

De hauts niveaux d'Egr-1 semblent promouvoir la transcription de gènes liés aux processus pathologiques cardiovasculaires, tels que l'athérosclérose, l'hypertension, l'ischémie/reperfusion et la resténose. Des études dans des modèles d'insultes vasculaires ont démontré l'association entre des niveaux élevés d'Egr-1 dans les CMLV et la croissance des CMLV ainsi que l'épaississement de l'intima. L'Egr-1 semble ainsi être impliqué dans les événements cellulaires induits par le H₂O₂ au cours de la pathogénèse des MCV. Cependant, les études décrivant les voies de signalisation menant à l'augmentation de l'expression de l'Egr-1 en réponse au H₂O₂ dans les CMLV restent inexplorées. Par conséquent, le but de cette étude est de déterminer quelles sont les voies de signalisation utilisées par le H₂O₂ dans l'induction de l'Egr-1 dans les CMLV.

CHAPITRE 2

ARTICLE

Early Growth response protein-1 (Egr-1) expression by Hydrogen Peroxide (H₂O₂) is mediated via IGF-1R, c-Src and PKC signaling in VSMC

In preparation for submission

Early Growth response protein-1 (Egr-1) expression by Hydrogen Peroxide (H₂O₂) is mediated via IGF-1R, c-Src and PKC signaling in VSMC

Vincent Rondeau and Ashok K. Srivastava

Laboratory of Cell Signaling, Research Center, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-CRCHUM, Department of Medecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H2X 0A9, Canada

Address of correspondence:

Ashok K. Srivastava, Ph.D

CRCHUM

Tour Viger

900 rue St-Denis,

Montreal, Qc,

H2X 0A9

Canada

Tel: 514-890-800 ext 23604

Fax: 514-412-7648

E-mail: ashok.srivastava@umontreal.ca

Abstract

Increased generation of reactive oxygen species (ROS) is believed to play a key role in the pathophysiology of cardiovascular diseases. Excessive growth and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) have been suggested to be a major contributor to vascular dysfunction. A potential involvement of Early growth response protein-1 (Egr-1), a zinc-finger transcription factor, in the development of vascular injury has been suggested. Recent studies have shown that hydrogen peroxide (H_2O_2), a ROS, increases Egr-1 expression in VSMC. However, signalling events leading to H_2O_2 -induced Egr-1 expression are not fully understood. Therefore, this study aims to examine the signalling pathways implicated in H_2O_2 -induced Egr-1 expression in VSMCs. H_2O_2 increased Egr-1 expression in a time and dose-dependent fashion in A10 VSMC. Pharmacological blockade of tyrosine kinases insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and c-Src, by AG1024 and PP2 respectively, abolished H_2O_2 -induced Egr-1 expression while AG1478, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor (EGFR), and PP3, the inactive analog of PP2, had no effect on Egr-1 expression. Pharmacological blockade of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and protein kinase C (PKC), by UO126 and rottlerin respectively, decreased H_2O_2 -induced Egr-1 expression. Moreover, pharmacological blockade of PKC by rottlerin decreased H_2O_2 -induced ERK1/2 phosphorylation. In summary, our data suggest that H_2O_2 triggers its effects on Egr-1 expression through upstream kinases IGF-1R and c-Src while PKC and ERK1/2 are both needed to promote H_2O_2 -induced Egr-1 expression in VSMC.

Key words: Egr-1, H_2O_2 , MAPK, ERK1/2, PKC, VSMC

Introduction

Aberrant proliferation, migration and growth of VSMC have been linked to the development of vascular dysfunctions leading to diseases such as atherosclerosis, hypertension, restenosis and ischemia (Jackson and Schwartz, 1992; Dickinson et al., 2014). Several reports have suggested that insulin-like growth factor-1 (IGF-1), angiotensin II (ANGII) and endothelin-1 (ET-1), well-known growth factors and vasoactive peptides to have many biological actions on blood vessels, might be involved in the progression of VSMC remodelling and dysfunction (Youreva and Srivastava, 2016; Weiss et al., 2001; Bohm and Pernow, 2007). Interestingly, all of these agents have the ability to promote oxidative stress by triggering reactive oxygen species (ROS) production through the activation of NAD(P)H oxidase (Daou and Srivastava, 2004; Vardatsikos et al., 2009; Youreva and Srivastava, 2016; Brown and Griendling, 2015). ROS have been reported to induce VSMC dysfunctions by inducing signalling events linked to cell growth, cell proliferation and cell migration (Griendling et al., 2000; Brown and Griendling, 2015). Among the ROS, hydrogen peroxide (H_2O_2), one of the most stable ROS, play a key role in mediating contractile and hypertrophic responses in the vasculature (Clemens and Griendling, 2006). In a model of hypertension, vascular levels of H_2O_2 have been reported to be increased and an exaggerated contractile response in arteries of spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to normotensive Wistar Kyoto rats (WKY) has been demonstrated (Gao and Lee, 2001). Well-known signalling pathways activated by H_2O_2 are the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3-K/PKB) pathways and the receptor and non-receptor tyrosine kinases IGF-1R and c-Src pathway (Baas and Berk,

1995; Blanc et al., 2004; Azar et al., 2006; Lyle and Griendling, 2006; Mehdi et al., 2007; Byon et al., 2016). These signalling events also induce the activation of several transcription factors implicated in the expression of genes linked to vascular remodelling (Clempus and Griendling, 2006). The early growth response protein-1 (Egr-1), a zinc finger transcription factor, can regulate the expression of several genes attributed in the pathogenesis of vascular disease (Khachigian, 2006). Several studies have suggested a potential role of Egr-1 in the development of atherosclerotic lesions, restenosis and neointimal thickening (Fahmy and Khachigian, 2000; McCaffrey et al., 2000; Lowe et al., 2001; Blaschke et al., 2004; Han and Liu, 2010). We have shown recently that IGF-1 enhances the expression of Egr-1 via a ROS-dependent pathway involving the activation of ERK1/2 in VSMC (Youreva and Srivastava, 2016). A role of H₂O₂ in Egr-1 expression and signalling events involved in this process in VSMC remain poorly characterized. In this study, the involvement of receptor and non-receptor tyrosine kinases and ERK1/2 in H₂O₂-induced Egr-1 expression has been investigated.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

H₂O₂ was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA) and cell culture reagents were procured from Invitrogen Corp. (Grand Island, New York, USA). AG1024 (IGF-1R inhibitor), AG1478 (EGFR inhibitor), PP2 (c-Src inhibitor), PP3 (inactive analog of PP2), UO126 (MEK1/2 inhibitor), rottlerin and rō-31-8220 (PKC inhibitors) were purchased from Calbiochem (San Diego, California, USA). Egr-1, β-tubulin, and anti-rabbit antibodies were from Cell Signalling (Beverly, Massachusetts, USA). The enhanced chemiluminescence (ECL) detection system kit was procured from Perkin Elmer (Montreal, Quebec, Canada).

Cell culture

A10 VSMC derived from thoracic aorta of embryonic rats were maintained in culture with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ exchange at 37°C. They were sub-cultured twice a week by harvesting them with trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The cells were made quiescent by incubating in serum-free DMEM 5 hours prior to treatment with H₂O₂ or other agents.

Cell lysis and immunoblotting

Confluent, serum-starved A10 VSMC grown to 80% confluence in 60-mm culture plates were pre-treated in the presence of various agents for 30 min, followed by stimulation with 100 μ M of H₂O₂ for different time point. Cells incubated in the absence or presence of various agents were washed three times with ice-cold phosphate buffer saline 1X (PBS 1X) and lysed on ice in 100 μ l of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 0,5% Na-deoxycholate; 1% NP40; 0,1% sodium dodecyl sulphate(SDS); 2 mM EDTA and 50 mM NaF) containing a cocktail of three inhibitors: phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail (PIC) and orthovanadate (OV), all diluted 1:100. The cell lysates were clarified by centrifugation at 13 000g for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford assay. Equal amounts of protein were subjected to 7.5% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, USA) and incubated overnight at 4°C with respective primary antibodies Egr-1 (1:1000) and β -tubulin (1:5000). The antigen-antibody complex was detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, dilution depending on primary antibody dilution, and protein bands were visualized by ECL. The intensity of the bands was quantified by densitometric analysis using Quantity One Bio-Rad Corp. imaging and Graphpad Prism 5 (San Diego, California, USA) software programs.

RNA preparation and reverse transcriptase

Cells were washed three times with ice-cold PBS and total RNA was isolated with Trizol Reagent (Life Technologies, Burlington, ON). RNA concentration was quantified with the Biophotometer at 260 nm and the purity was determined by the A260/A280 ratio (Eppendorf, Mississauga, ON). cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA using High Capacity RNA-to cDNA Kit (Applied Biosystems, Grand Island, NY) as per manufacturer's instructions in a final volume of 20 μ l. cDNA was stored at -20 until use.

qRT-PCR analysis

Real-time quantitative PCR was performed with SYBG (Life Technologies, Grand Island, NY) using 2 μ l of cDNA in a final volume of 10 μ l. Real-time PCR amplification was performed using 7500 fast RT-PCR system (Applied Biosystems, Grand Island, NY). The expression of Egr-1 mRNA was assessed using the following primers: forward 5'-ctgcttcacgtcttctctctg-3' and reverse 5'- GTCAGTGTTGGGAGTAGGAAAG-3'. Egr-1 mRNA expression was normalized with the β -actin mRNA level using primers: forward 5'-TCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' and reverse 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGA-3'.

Statistics

Statistical analysis was performed by one-way, repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test using Graphpad Prism 5 (San Diego, California, USA) software program. All data are reported as the mean \pm SEM. The differences between means were considered significant at $P < 0.05$.

Results

H₂O₂ induces Egr-1 expression in a dose and time-dependent fashion

As shown in figure 1A, treatment of VSMC with 100 μ M of H₂O₂ increased the expression of Egr-1 in a time-dependent manner. The protein band corresponding to Egr-1 could be detected only after 60 min of stimulation, which peaked at 120 min of treatment and eventually decreased after 240 min of treatment. Moreover, H₂O₂-induced Egr-1 expression was also dose-dependent (Fig 1B). Using 60 min treatment with different H₂O₂ concentrations, an increase in Egr-1 expression was detected at 25 μ M of H₂O₂, which further increased as the H₂O₂ concentration was raised further. In fact, a 100 μ M dose of H₂O₂ showed the highest level of Egr-1 expression out of all the doses tested.

H₂O₂ mediates Egr-1 expression through tyrosine kinase receptor IGF-1R and non-receptor tyrosine kinase c-Src

Tyrosine kinases play a critical role in activating many signalling pathways implicated in cardiovascular diseases (Knock, 2015). Since the insulin-like growth factor receptor type-1 (IGF-1R) and c-Src are well-known effectors in transducing the effect of H₂O₂ on cell signalling pathways, (Mehdi et al., 2007; Byonet al., 2016 Azar et al., 2007) we investigated if H₂O₂-induced Egr-1 expression would also involve these two upstream effectors. Using AG1024 as an IGF-1R inhibitor and AG1478, as an EGFR inhibitor, we observed that Egr-1 expression was significantly down-regulated by treatment of VSMC with AG1024 while AG1478 was ineffective in altering H₂O₂-induced Egr-1 expression (Fig 2A). To probe the involvement of the c-Src family of tyrosine kinases with H₂O₂-induced responses, we utilized PP2, a selective inhibitor of the c-Src family, and PP3, a negative control of c-Src inhibitor PP2. As shown in figure 2B, PP2 almost completely

attenuated H₂O₂-induced Egr-1 expression while PP3 did not exert any inhibitory effect on Egr-1 expression. These results demonstrated that H₂O₂ uses IGF-1R and c-Src transactivation to mediate Egr-1 upregulation in VSMC.

H₂O₂-induced Egr-1 expression involves MEK/ERK1/2

Since H₂O₂ has the ability to activate the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway (Blanc et al., 2004; Guyton et al., 1996) and that Egr-1 expression is regulated by MAPK activation (Youreva and Srivastava, 2016; Simo-Cheyou et al., 2016; Kapakos et al., 2012), we next determined the involvement of ERK1/2 in H₂O₂-induced Egr-1 expression. For these studies, specific pharmacological inhibitor of the mitogen-extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) kinase (MEK1/2), UO126 was used. As shown in Fig 3, pharmacological blockade of MEK/ERK1/2 by UO126 attenuated Egr-1 expression enhanced by H₂O₂. These data indicate that MEK/ERK1/2 signalling pathway plays a role in Egr-1 expression in response to H₂O₂ in VSMC.

PKC is an upstream mediator of ERK1/2 in H₂O₂-induced Egr-1

Since many reports have shown that protein kinase C (PKC) is activated by H₂O₂ (Konishi et al., 1997; Steinberg et al., 2015), and we have shown earlier that PKC is required to induce ERK1/2 phosphorylation in VSMC (Blanc et al., 2004), we next evaluated the implication of PKC in H₂O₂-induced Egr-1 expression. For these studies, rottlerin and rō-31-8220, well known pharmacological inhibitor of PKC, were used. As shown in Figure 4 A and B, pharmacological blockade of PKC by these agents resulted in a significant decrease in H₂O₂-induced Egr-1 expression. These data show that PKC is an upstream regulator of ERK1/2 phosphorylation in H₂O₂-induced Egr-1 expression.

Pharmacological blockade of IGF-1R, c-Src, ERK1/2 and PKC attenuate H₂O₂-induced Egr-1 mRNA expression

In order to determine whether H₂O₂-induced changes in Egr-1 protein expression correlated with alterations at the mRNA levels, we performed qRT-PCR analysis. As shown in Figure 5, similar to the immunoblotting data, treatment of VSMC with H₂O₂ increased Egr-1 mRNA levels and, pharmacological inhibitors of IGF-R and Src family tyrosine kinases, as well as ERK1/2 and PKC pathways suppressed H₂O₂-induced Egr-1 mRNA expression in VSMC.

Discussion

ROS have been implicated in the pathogenesis of vascular diseases such as atherosclerosis and hypertension (Dhalla et al., 2000; Fearon and Faux, 2009). Remodelling of vasculature, due to an aberrant proliferation, hypertrophy and migration of VSMC has been suggested to play a key role in this process (Gomez and Owens, 2012). Among various ROS, H_2O_2 which is relatively more stable and cell permeable, has been demonstrated to activate signalling pathways that regulate cell proliferation, hypertrophy and migration of VSMC (Byon et al., 2016; Brown and Griendling, 2015). In the present studies, we have demonstrated that H_2O_2 potently activates the expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor implicated in the pathogenesis of vascular diseases (Khachigian et al., 2016). By using AG1024 and PP2, specific pharmacological inhibitors of IGF-1R and SRC family of tyrosine kinases respectively, we demonstrated the involvement of these two kinases in triggering H_2O_2 -induced Egr-1 expression in VSMC. In fact, the inhibition of any of these kinases was sufficient to decrease dramatically the effect of H_2O_2 on Egr-1 expression. In addition, our studies also show that ERK1/2 activation is essential to trigger the induction of Egr-1 by H_2O_2 in VSMC. A role of IGF-1R and c-Src in H_2O_2 -induced activation of ERK phosphorylation in VSMC has already been demonstrated earlier (Azar et al., 2006; Mehdi et al., 2007) and, an involvement of the ERK pathway in inducing Egr-1 expression in response to IGF-1 (Youreva and Srivastava, 2016) and several other stimuli has also been reported (Simocheyou et al., 2016; Kapakos et al., 2012). However, the data presented here, provide novel information linking IGF-1R in the signalling cascade responsible to induce Egr-1 expression in response to H_2O_2 in VSMC.

By using PP2, we also provided evidence for the participation of the SRC family of non-receptor tyrosine kinases in mediating the H₂O₂-induced Egr-1 expression both at the protein and mRNA level in VSMC. Our earlier work has suggested a requirement of c-Src, a prominent member of SRC family, to propagate the H₂O₂-induced ERK1/2 phosphorylation in VSMC (Mehdi et al., 2007). We have also recently demonstrated that ET-1-induced Egr-1 expression is mediated via c-Src-dependent ERK1/2 pathway (Simocheyou et al., 2016). An involvement of c-Src in ANGII-induced ROS generation and signalling responses in VSMC has also been documented (Touyz et al., 2001). A role of c-Src in enhanced ERK1/2 phosphorylation and Gq alpha protein expression in VSMC isolated from SHR have also been reported (Atef and Anand-Srivastava, 2016) and pharmacological blockade of c-Src has been shown to improve cardiovascular function and reduce the development of hypertension in ANG-II-infused animal models of hypertension (Qin and Zhou, 2015; Callera et al., 2016). These observations are consistent with a key role of c-Src as an effector of signalling pathways implicated in the VSMC function.

Using rottlerin and rō-31-8220, two broad-spectrum inhibitors of PKC, we demonstrated that H₂O₂-induced Egr-1 expression is dependent on the PKC signalling pathway. Interestingly, PKC inhibition by rottlerin also decreased ERK1/2 phosphorylation suggesting that PKC is an upstream regulator of ERK1/2 phosphorylation in response to H₂O₂ in VSMC (data not shown). Rottlerin was also found to inhibit lysophosphatidic acid-induced Egr-1 expression in VSMC via a PKC delta dependent ERK1/2-dependent pathway (Iyoda et al., 2012). Notably, PKC delta has been implicated in modulating ANGII-induced hypertrophic responses in VSMC

(Nakashima et al., 2008) and an upregulation of PKC delta in VSMC from SHR has recently been demonstrated (Atef and Anand-Srivastava, 2016). Moreover, some isoforms of PKC are known to be regulated by redox-dependent pathway involving tyrosine phosphorylation (Steinberg et al., 2015), particularly c-Src mediated phosphorylation of PKC delta Tyr 311 has been shown to result in its activation (Nakashima et al., 2008). Thus, it may be suggested that H₂O₂-induced activation of PKC via c-Src serves as a trigger to induce ERK1/2 phosphorylation leading to Egr-1 expression in VSMC.

In summary, our data have demonstrated the involvement of PKC and c-Src-dependent activation of ERK1/2 pathways in H₂O₂-induced Egr-1 expression. Given the important role of ROS and ERK1/2 signaling in the pathogenesis of vascular dysfunction, it may be suggested that H₂O₂-induced upregulation of Egr-1 may have a potential role in the pathobiology of vascular disease.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Dr. John Chan lab members for letting us use the 7500 fast RT-PCR system.

References List

- Atef ME, Anand-Srivastava MB. Oxidative stress contributes to the enhanced expression of Gqalpha/PLCbeta1 proteins and hypertrophy of VSMC from SHR: role of growth factor receptor transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(5):H608-18.
- Atef ME, Anand-Srivastava MB. Role of PKCdelta in Enhanced Expression of Gqalpha/PLCbeta1 Proteins and VSMC Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS One*. 2016;11(7):e0157955.
- Azar ZM, Mehdi MZ, Srivastava AK. Activation of insulin-like growth factor type-1 receptor is required for H₂O₂-induced PKB phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2006;84(7):777-86.
- Azar ZM, Mehdi MZ, Srivastava AK. Insulin-like growth factor type-1 receptor transactivation in vasoactive peptide and oxidant-induced signalling pathways in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2007;85(1):105-11.
- Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1995;77(1):29-36.
- Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Distinct roles of Ca²⁺, calmodulin, and protein kinase C in H₂O₂-induced activation of ERK1/2, p38 MAPK, and protein kinase B signaling in vascular smooth muscle cells. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2004;6(2): 353-66.
- Blaschke F, Bruemmer D, Law RE. Egr-1 is a major vascular pathogenic transcription factor in atherosclerosis and restenosis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2004;5(3):249-54.
- Bohm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2007;76(1):8-18.
- Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation Research*. 2015;116(3):531-49.
- Byon CH, Heath JM, Chen Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox biology*. 2016;9:244-53.

- Callera GE, Antunes TT, He Y, Montezano AC, Yogi A, Savoia C, et al. c-Src Inhibition Improves Cardiovascular Function but not Remodeling or Fibrosis in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension*. 2016;68(5):1179-90.
- Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. 2006;71(2):216-25.
- Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;37(2):208-15.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-73.
- Dickinson MG, Kowalski PS, Bartelds B, Borgdorff MA, van der Feen D, Sietsma H, et al. A critical role for Egr-1 during vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research*. 2014;103(4):573-84.
- Fahmy RG, Khachigian LM. Suppression of growth factor expression and human vascular smooth muscle cell growth by small interfering RNA targeting EGR-1. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100(6):1526-35.
- Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(3):372-81.
- Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A₂ production. *British journal of pharmacology*. 2001;134(8):1639-46.
- Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2012;95(2):156-64.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(10):2175-83.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(8):4138-42.

- Han W, Liu GN. EGR-1 decoy ODNs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia of balloon-injured arteries in rat. *Life sciences*. 2010;86(7-8):234-43.
- Iyoda T, Zhang F, Sun L, Hao F, Schmitz-Peiffer C, Xu X, et al. Lysophosphatidic acid induces early growth response-1 (Egr-1) protein expression via protein kinase Cdelta-regulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2012;287(27):22635-42.
- Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension*. 1992;20(6):713-36.
- Kapakos G, Youreva V, Srivastava AK. Attenuation of endothelin-1-induced PKB and ERK1/2 signaling, as well as Egr-1 expression, by curcumin in A-10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(9):1277-85.
- Khachigian LM. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circulation research*. 2006;98(2):186-91.
- Knock GA. Tyrosine kinases as key modulators of smooth muscle function in health and disease. *The Journal of Physiology*. 2015;593(17):3805-6.
- Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(21):11233-7.
- Lowe HC, Fahmy RG, Kavurma MM, Baker A, Chesterman CN, Khachigian LM. Catalytic oligodeoxynucleotides define a key regulatory role for early growth response factor-1 in the porcine model of coronary in-stent restenosis. *Circulation research*. 2001;89(8):670-7.
- Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signalling by reactive oxygen species. *Physiology*. 2006;21:269-80.
- McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, Bush H, Jr., et al. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(5):653-62.
- Mehdi MZ, Azar ZM, Srivastava AK. Role of receptor and nonreceptor protein tyrosine kinases in H₂O₂-induced PKB and ERK1/2 signaling. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2007;47(1):1-10.

- Nakashima H, Frank GD, Shirai H, Hinoki A, Higuchi S, Ohtsu H, et al. Novel role of protein kinase C-delta Tyr 311 phosphorylation in vascular smooth muscle cell hypertrophy by angiotensin II. *Hypertension*. 2008;51(2):232-8.
- Qin B, Zhou J. Src Family Kinases (SFK) Mediate Angiotensin II-Induced Myosin Light Chain Phosphorylation and Hypertension. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127891.
- Simo-Cheyou ER, Vardatsikos G, Srivastava AK. Src tyrosine kinase mediates endothelin-1-induced early growth response protein-1 expression via MAP kinase-dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med*. 2016.
- Steinberg SF. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. *Frontiers in Pharmacology*. 2015;6:128.
- Touyz RM, Wu XH, He G, Park JB, Chen X, Vacher J, et al. Role of c-Src in the regulation of vascular contraction and Ca²⁺ signaling by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2001;19(3):441-9.
- Vardatsikos G, Sahu A, Srivastava AK. The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation, and clinical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 11(5): 1165-90.
- Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation*. 2001;103(3):448-54.
- Youreva V, Srivastava AK. Early Growth Response Protein-1 Expression by Insulin-Like Growth Factor-1 Requires ROS-Dependent Activation of ERK1/2 and PKB Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(1):152-62.

Figure Legends

Figure 1. Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases early growth response protein-1 (Egr-1) expression in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC) in a time and dose-dependent fashion.

Confluent, serum-starved quiescent A10 VSMC were treated in the absence (CTL) or presence of 100 μM of H₂O₂ for indicated time (**A**), or with increasing doses of H₂O₂ for 60 min (**B**). Cell lysates were probed with Egr-1 antibody (top panel) and also analyzed for protein loading, using β-tubulin (middle panel). Bar diagrams (bottom panel) represent the densitometric quantifications of Egr-1 relative to β-tubulin. Values are the means ± SEM of three independent experiments and expressed as a ratio where the control values are taken as 1. ** P<0.01 and * P<0.05, compared to CTL.

Figure 2. Attenuation of hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced early growth response protein-1 (Egr-1) expression by pharmacological inhibitors AG1024 (IGF-1R-PTK inhibitor) and PP2 (c-Src non-receptor PTK inhibitor) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC), but not by pharmacological inhibitor AG1478 (EGFR-PTK inhibitor) and the inactive analog of PP2, PP3.

Confluent, serum-starved quiescent A10 VSMC were pre-treated with (+) or without (-) 10 μM of AG1024 (IGF-1R PTK inhibitor) or AG1478 (PTK inhibitor) (**A**) and 10 μM PP2 (selective c-Src non-receptor PTK inhibitor) or PP3 (inactive analog of PP2) (**B**) for 30 min, followed by stimulation with 100 μM of H₂O₂ for 60 min. Cell lysates were probed with Egr-1 antibody (top panel) and also analyzed for protein loading, using β-tubulin (middle panel). Bar diagrams (bottom panel) represent the densitometric quantifications of Egr-1 relative to β-tubulin. Values are the means ± SEM of three independent experiments and expressed as a ratio where the control values are taken as 1. *** P<0.001 compared to CTL; #### P<0.001 compared to VSMC treated with H₂O₂ alone.

Figure 3. Reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced early growth response protein-1 (Egr-1) expression by pharmacological inhibitor UO126 (MEK1/2 inhibitor) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).

Confluent, serum-starved quiescent A10 VSMC were pre-treated with (+) or without (-) 10 μ M of UO126 (MEK1/2 inhibitor) for 30 min followed by stimulation with 100 μ M of H₂O₂ for 60 min. Cell lysates were probed with Egr-1 antibody (top panel) and also analyzed for protein loading, using β -tubulin (middle panel). Bar diagrams (bottom panel) represent the densitometric quantifications of Egr-1 relative to β -tubulin. Values are the means \pm SEM of three independent experiments and expressed as a ratio where the control values are taken as 1. *** P<0.001 compared to CTL; ### P<0.01 compared to VSMC treated with H₂O₂ alone.

Figure 4. Decrease in early growth response protein-1 (Egr-1) expression induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) by pharmacological inhibitors rottlerin and r -31-8220 (PKC inhibitors) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).

Confluent, serum-starved quiescent A10 VSMC were pre-treated with (+) or without (-) 10 μ M of rottlerin (**A**) or r -31-8220 (**B**) (PKC inhibitor) for 30 min followed by stimulation with 100 μ M of H₂O₂ for 60 min. Cell lysates were probed with Egr-1 antibody (top panel) and also analyzed for protein loading, using β -tubulin (middle panel). Bar diagrams (bottom panel) represent the densitometric quantifications of Egr-1 relative to β -tubulin. Values are the means \pm SEM of three independent experiments and expressed as a ratio where the control values are taken as 1. *** P<0.001 compared to CTL; ### P<0.01 compared to VSMC treated with H₂O₂ alone.

Figure 5. Inhibition of Egr-1 mRNA level induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) with pharmacological inhibitors AG1024 (IGF-1R-PTK inhibitor), PP2 (c-Src non-receptor PTK inhibitor), UO126 (MEK1/2 inhibitor), rottlerin and r -31-8220 (PKC inhibitors) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC).

Confluent, serum-starved quiescent A10 VSMC were pre-treated with either 10 μ M of AG1024 (IGF-1R PTK inhibitor), 10 μ M PP2 (selective c-Src non-receptor PTK inhibitor), 10 μ M of UO126 (MEK1/2 inhibitor) or 10 μ M of rottlerin or r -31-8220 (PKC inhibitor) for 30 min followed by stimulation with 100 μ M of H₂O₂ for 60 min. Analysis of relative Egr-1 mRNA levels was performed by using qRT-PCR. Values are the means \pm SEM of three independent experiments and expressed as a ratio where the control values are taken as 1. *** P<0.001 compared to CTL; ### P<0.01 compared to VSMC treated with H₂O₂ alone.

A.

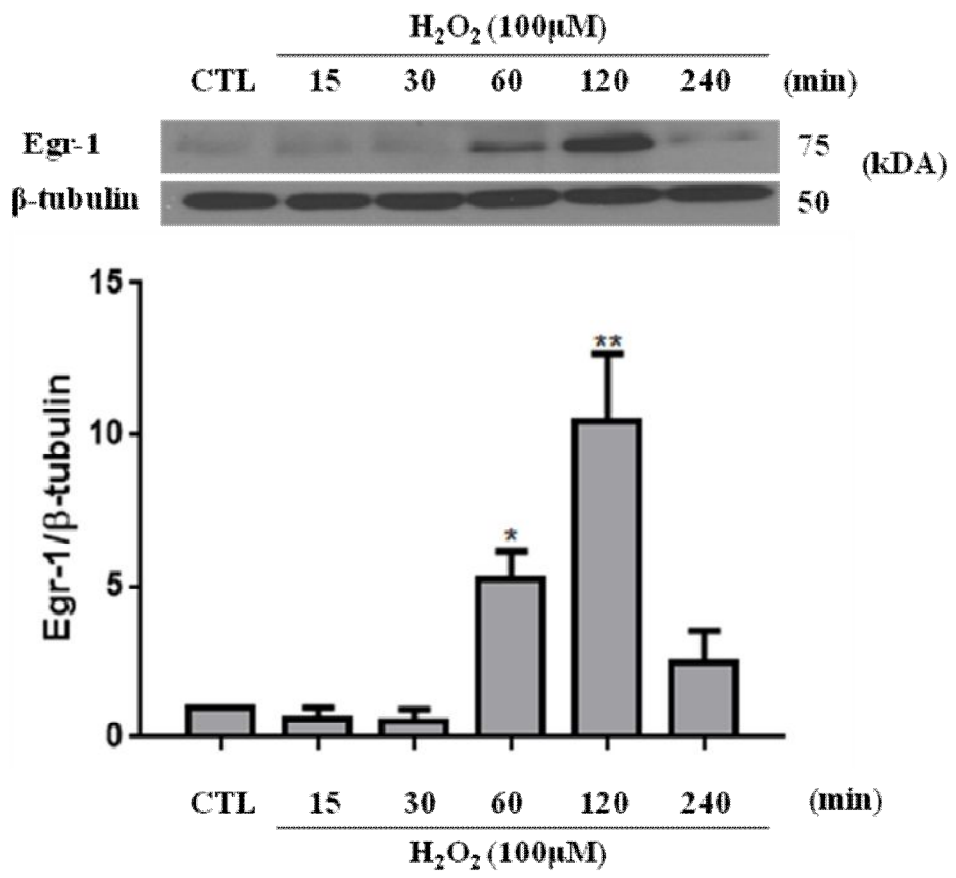


Figure 1

B.

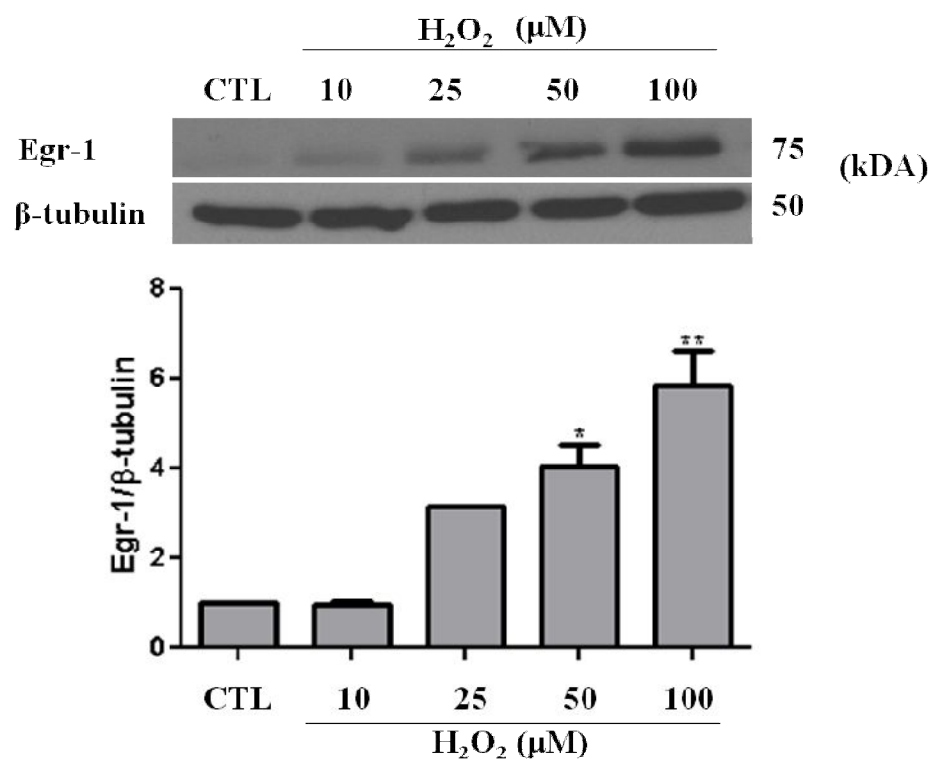


Figure 1

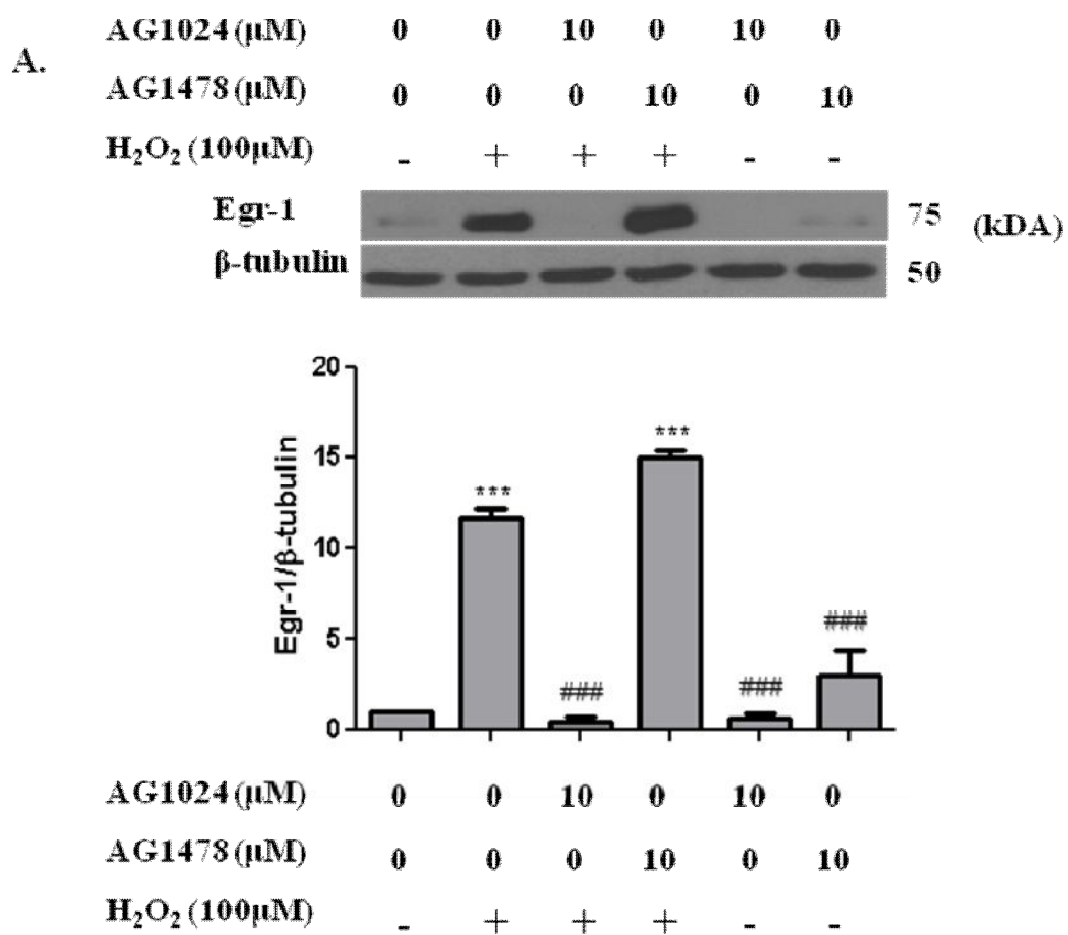


Figure 2

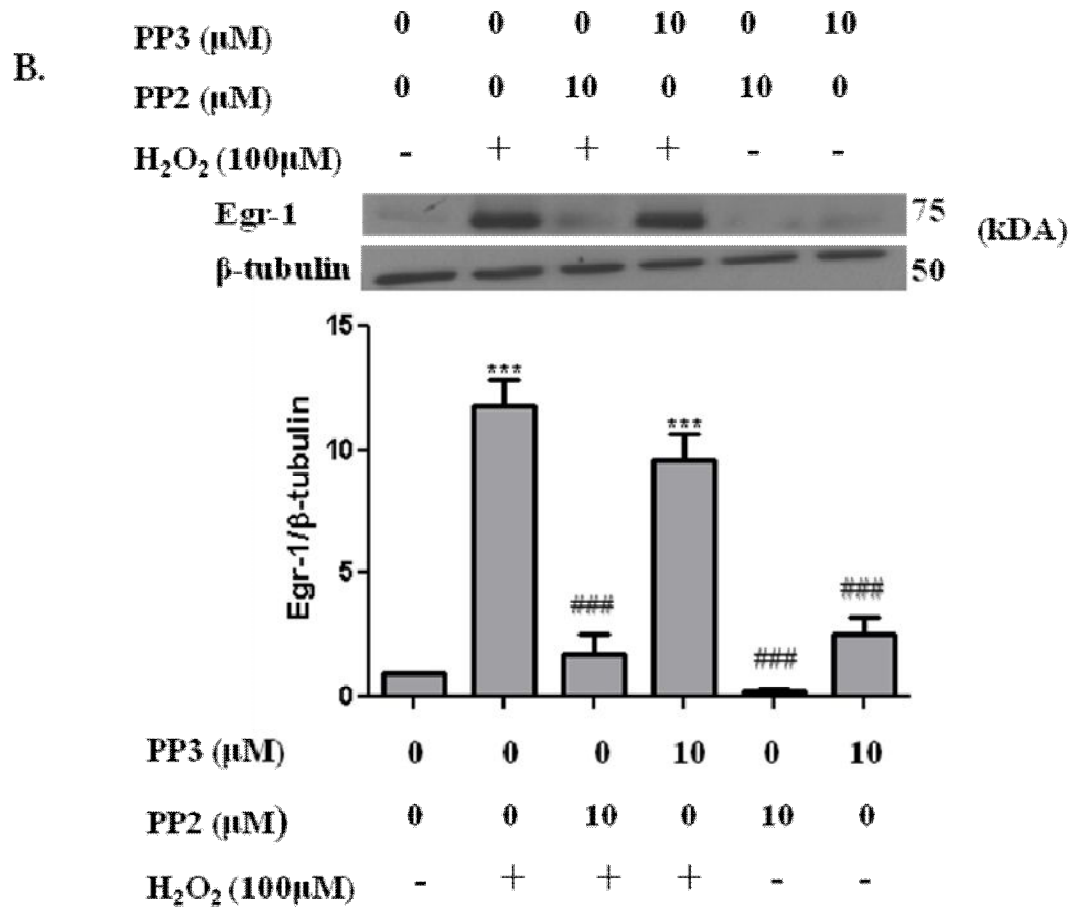


Figure 2

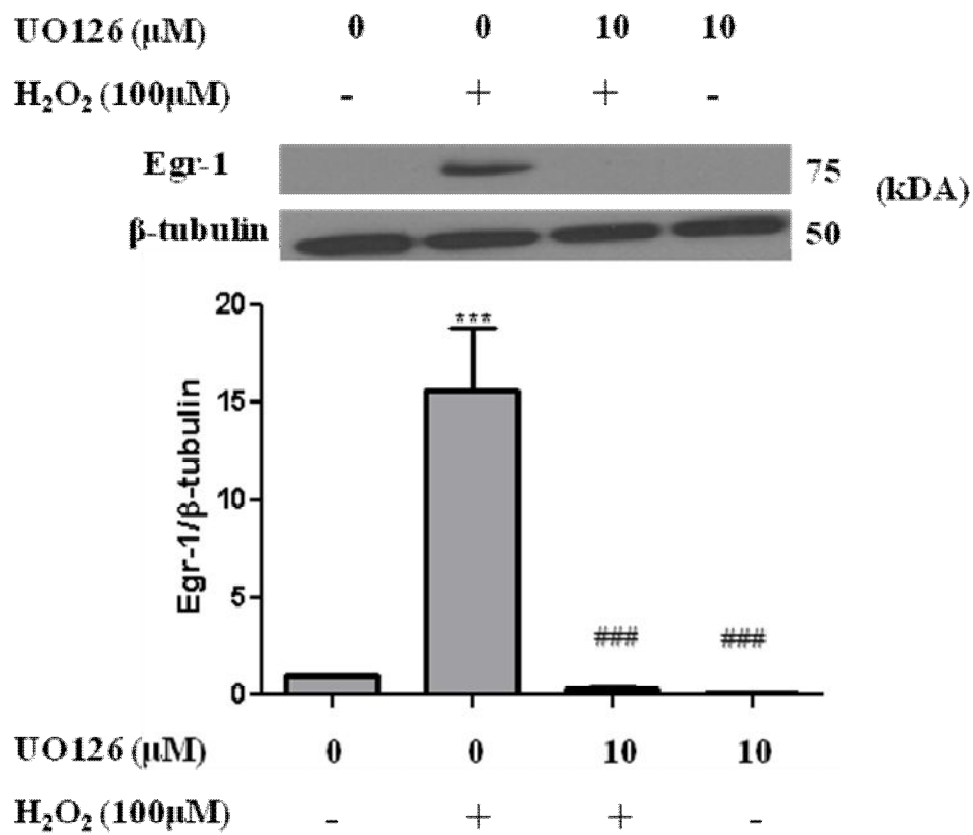


Figure 3

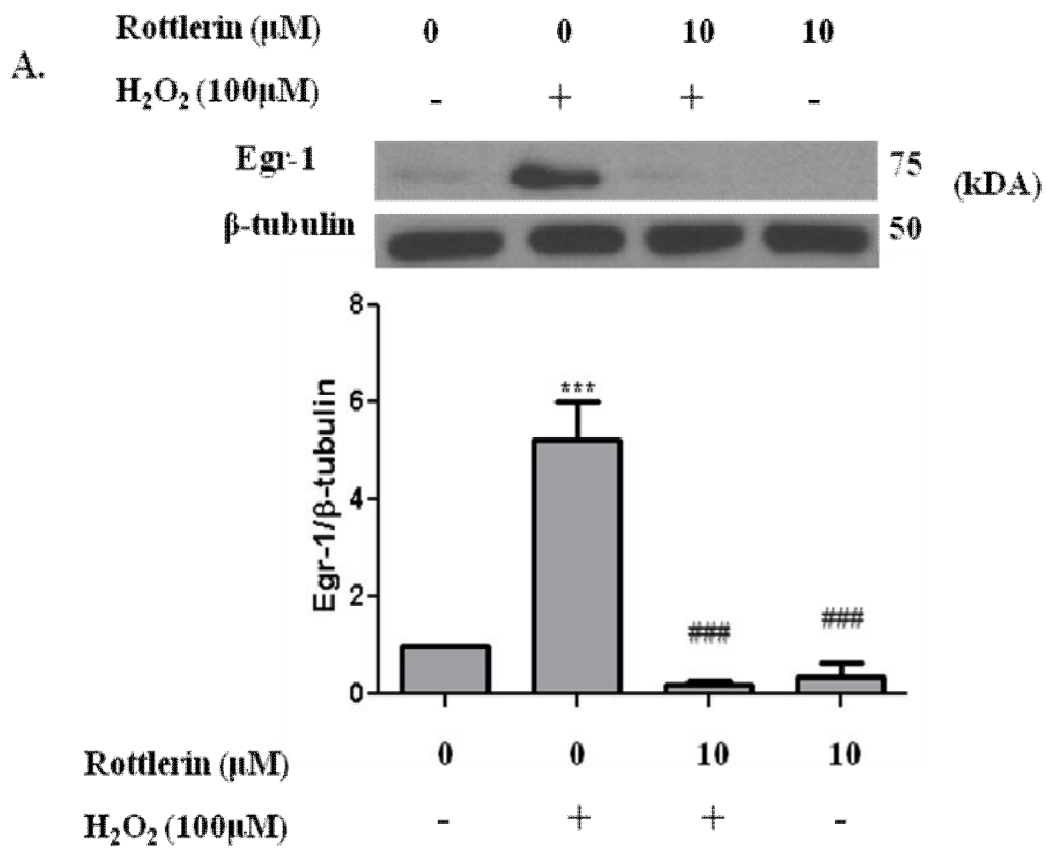


Figure 4

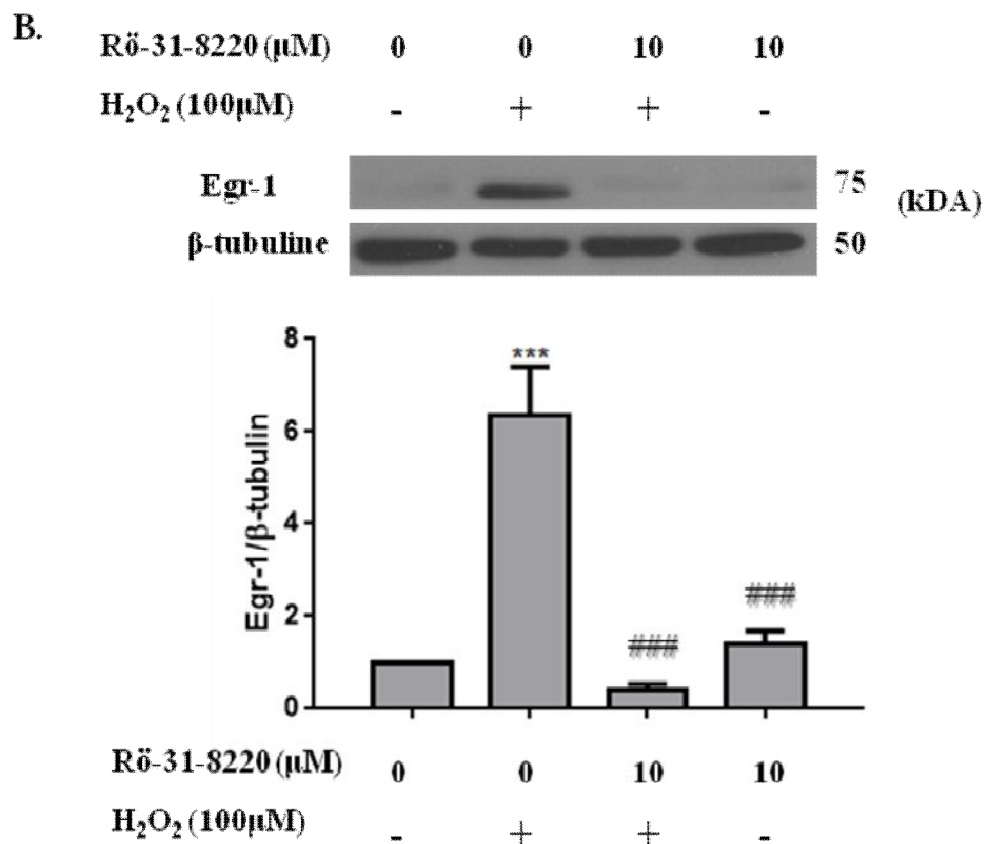


Figure 4

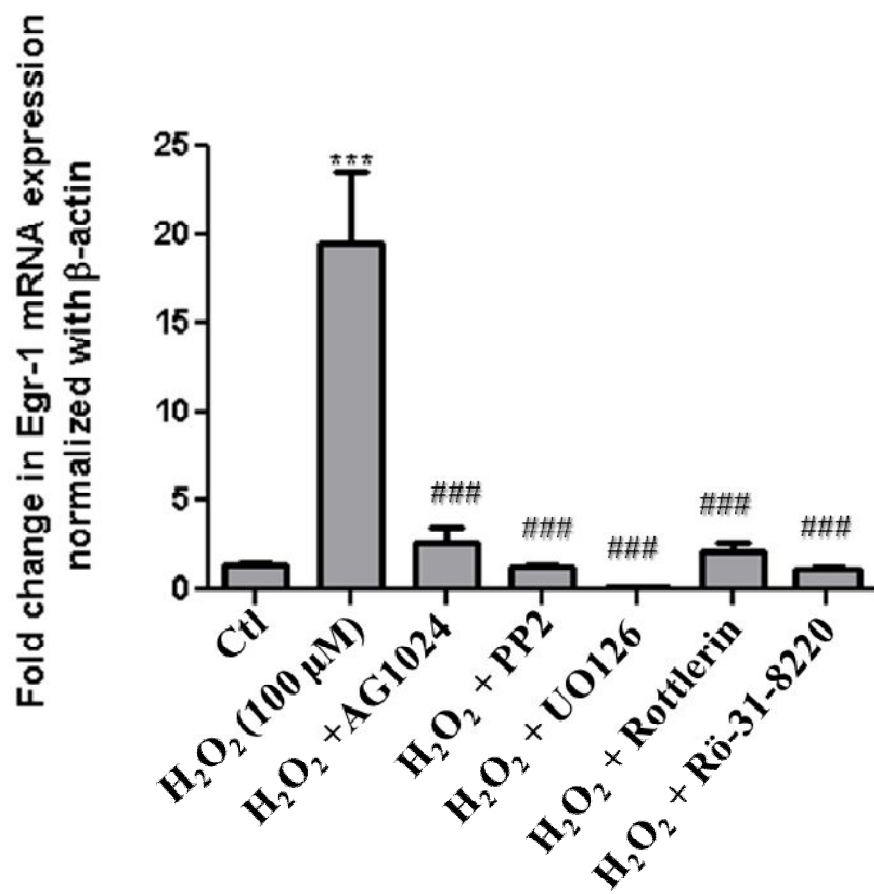


Figure 5

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

La prolifération et la migration des CMLV sont deux mécanismes clés dans le remodelage vasculaire. Ces événements pathophysiologiques caractéristiques des MCV sont déclenchés par des stimuli hormonaux ou physiques favorisant la formation des MCV telles que l'athérosclérose et l'hypertension artérielle. Ces stimuli ont également la capacité de promouvoir le stress oxydatif via la production des DRO pour favoriser la progression des MCV. Au niveau du système vasculaire, le H_2O_2 est un effecteur puissant capable de promouvoir les voies de signalisation en relation avec la prolifération et la croissance des CMLV. Ses effets peuvent être médiés par le facteur de transcription Egr-1 puisque son expression augmente de façon dose-dépendante en présence du H_2O_2 . Pour cette raison, l'expression de l'Egr-1 en réponse au H_2O_2 est liée à différentes voies de signalisation qui restent à identifier au niveau des CMLV. En premier lieu, le H_2O_2 utilise le récepteur tyrosine kinase IGF-1R pour déclencher les voies de signalisation menant à l'expression de l'Egr-1. De plus, la tyrosine kinase cytosolique c-Src est également impliquée dans la transduction du signal puisque son inhibition diminue l'expression de l'Egr-1 induite par le H_2O_2 .

La voie de signalisation des MAPK, plus précisément celle de l'ERK1/2, est impliquée dans l'activation de l'Egr-1 suite à une exposition des CMLV au H_2O_2 . En effet, l'inhibition pharmacologique de l'ERK1/2 diminue de façon significative l'expression de l'Egr-1 induite par le H_2O_2 . Une activation excessive de l'ERK1/2 est reconnue pour entraîner diverses anomalies vasculaires. En effet, la phosphorylation de l'ERK1/2 est importante dans l'activation de plusieurs effecteurs agissant sur les phénomènes de remodelage cellulaire. Par exemple, l'histone déacétylase 4, une protéine réprimant la transcription génique par la déacétylation des histones, peut s'associer à

l'ERK1/2 pour favoriser le remodelage de la chromatine (132). L'ERK1/2 peut aussi se lier à la protéine c-Myc, un oncogène régulant des gènes associés à la prolifération cellulaire, pour en favoriser son activité transcriptionnelle (133). De plus, il est intéressant de constater que la voie de signalisation de l'ERK1/2 est inhibée par l'exendine-4, un agoniste du récepteur de *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) traitant le diabète de type 2 et ayant des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire (134). Cela permet de diminuer la prolifération ainsi que la migration des CMLV (134). Bref, l'ERK1/2 est une protéine très importante lorsque vient le temps d'analyser les effets prolifératifs et hypertrophiques de plusieurs molécules favorisant les MCV.

La voie de signalisation de la PKC est impliquée dans l'expression de l'Egr-1 induite par le H₂O₂ comme en fait foi son inhibition par différents agents pharmacologiques. Dans la prolifération des fibroblastes induite par le TGF-β, l'inhibition de l'isoforme PKCζ empêche cet effet du TGF-β démontrant un rôle de la PKC dans la prolifération cellulaire (135). Un rôle de l'isoforme PKCβ a été démontré lors d'un stress oxydatif causé par l'adipogénèse (127). Cette famille de kinase est également impliquée dans la croissance des CMLV. L'isoforme PKCε a la capacité de se lier à Raf-1 pour que ce complexe puisse activer la cascade des MAPK (136). Cela engendre la phosphorylation de la *caldesmon* pour libérer l'actine pour qu'elle soit en mesure d'interagir avec la myosine pour favoriser la contraction des CMLV (137).

La présente étude fut réalisée dans le but d'élucider les effets du H₂O₂ sur l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV. L'expression de l'Egr-1 augmente en fonction du temps d'exposition au H₂O₂ et de la dose du H₂O₂ choisie. Nous avons observé que le H₂O₂ utilise les tyrosines kinases IGF-1R et c-Src pour initier l'expression de l'Egr-1

dans les CMLV. Les voies de la PKC et de l'ERK1/2 sont également impliquées dans l'expression de l'Egr-1 induite par le H₂O₂.

En tout et pour tout, nos résultats démontrent une implication de l'IGF-1R, de c-Src, de l'ERK1/2 et de la PKC dans l'expression de l'Egr-1 en réponse au H₂O₂ dans les CMLV. Puisque le H₂O₂ augmente l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV par le biais des voies de signalisation associées au remodelage vasculaire, il serait important de considérer ces événements intracellulaires dans le but de développer de nouvelles thérapies pouvant prévenir les anomalies vasculaires.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Les recherches menées lors de cette étude ont permis de démontrer que l'expression de l'Egr-1 induite par le H₂O₂ est initiée par l'IGF-1R et c-Src alors que l'activation de la voie de l'ERK1/2 de même que l'activation de la voie des PKC sont nécessaires pour transmettre ce signal. Ces résultats furent obtenus grâce à l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques UO126, rottlerin, rō-31-8220, AG1024 et PP2, bloquant respectivement l'ERK1/2, la PKC, l'IGF-1R et c-Src (Figure 4.1).

En tant que DRO, le H₂O₂ a été proposé comme étant une molécule pouvant augmenter la probabilité de développer des MCV. Cependant, les mécanismes précis impliquant le H₂O₂ dans le développement des MCV restent encore à être élucidés. Puisque le H₂O₂ augmente l'expression de l'Egr-1, un facteur de transcription ayant un rôle dans le remodelage vasculaire, il est suggéré que le H₂O₂ utilise l'Egr-1 pour promouvoir le développement des MCV. Même si cette étude révèle quelles sont les voies de signalisation que le H₂O₂ utilise pour augmenter l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV, d'autres études sont nécessaires pour éclaircir le mécanisme global permettant l'expression de l'Egr-1 dans l'optique de développer de nouvelles techniques thérapeutiques pour traiter les MCV.

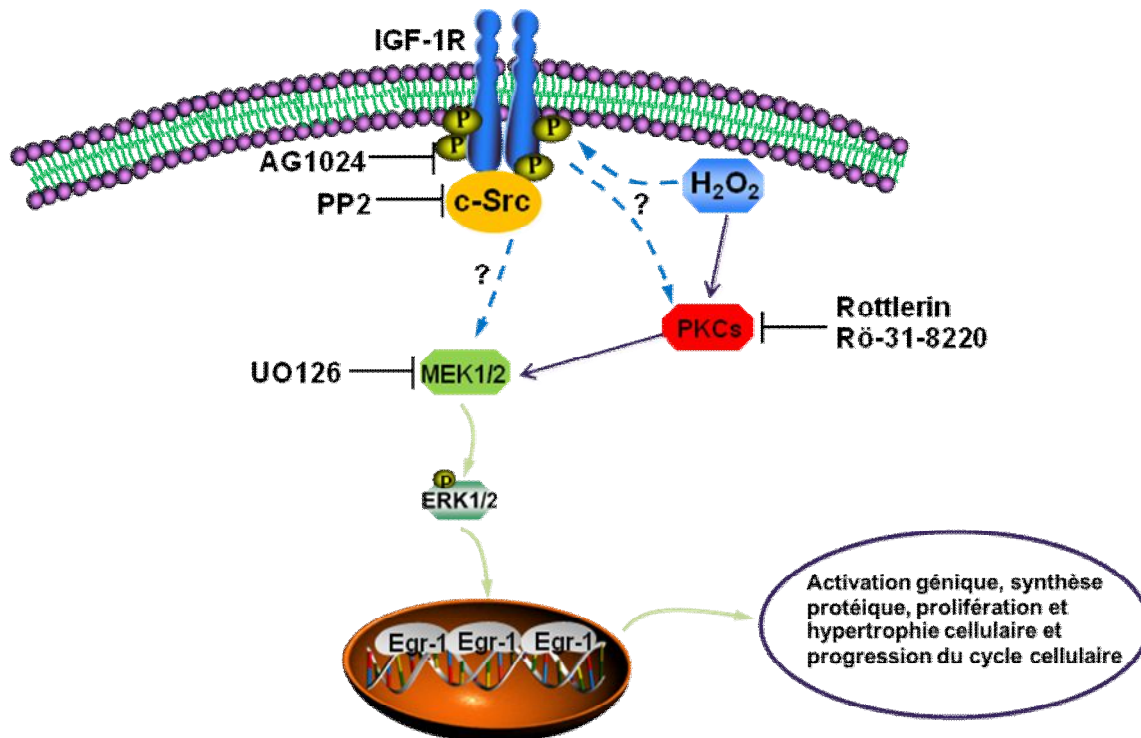


Figure 4.1. Schéma hypothétique montrant les étapes menant à l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV. L'activation de l'IGF-1R et de c-Src semble nécessaire pour induire l'expression de l'Egr-1 vu que son expression fut réduite par l'AG1024 et la PP2 respectivement. La PKC est nécessaire à l'expression de l'Egr-1 puisque les inhibiteurs spécifiques rottlerin et rö-31-8220 entraînent une inhibition de l'Egr-1. L'expression de l'Egr-1 est bloquée par l'inhibiteur spécifique de l'ERK1/2, UO126. Ces éléments tendent à confirmer que le H₂O₂ utilise l'IGF-1R et c-Src pour démarrer la signalisation intracellulaire menant à l'augmentation de l'expression de l'Egr-1 dans les CMLV tandis que la PKC et l'ERK1/2 sont les kinases intermédiaires permettant d'augmenter l'expression de l'Egr-1. Le mécanisme permettant de lier les tyrosines kinases IGF-1R et c-Src à la PKC et à l'ERK1/2 reste à être déterminé.

CHAPITRE 5

RÉFÉRENCES

1. World Health Organization. Fact sheet No 317: Cardiovascular disease. WHO Media Center (2013).
2. Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999; 340:115-26.
3. Michiels C. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*. 2003; 196(3): 430-43.
4. Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annual Review of Physiology*. 2013; 75: 23-47.
5. Davis-Dusenbery BN, Wu C, Hata A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011; 31(11):2370-7.
6. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(10):2175-83.
7. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signalling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. 2006; 71(2):216-25.
8. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*. 2000; 86(5):494-501.
9. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, et al. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003;107(7):1053-8.
10. Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, et al. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10527-31.
11. Ohba M, Shibamura M, Kuroki T, Nose K. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol*. 1994;126(4):1079-88.
12. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signalling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2004; 37(8):1263-73.

13. Nose K, Ohba M. Functional activation of the egr-1 (early growth response-1) gene by hydrogen peroxide. *The Biochemical journal*. 1996;316 (Pt 2):381-3.
14. Aggeli IK, Beis I, Gaitanaki C. ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2010; 59(3):443-54.
15. Jin N, Hatton ND, Harrington MA, Xia X, Larsen SH, Rhoades RA. H₂O₂-induced egr-1, fra-1, and c-jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine*. 2000;29(8):736-46.
16. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodelling in hypertension. *International Journal of Hypertension*. 2013;2013: 808353.
17. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circulation research*. 2000;86(2):125-30.
18. Dange RB, Agarwal D, Teruyama R, Francis J. Toll-like receptor 4 inhibition within the paraventricular nucleus attenuates blood pressure and inflammatory response in a genetic model of hypertension. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:31. Epub 2015/04/17.
19. Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004; 287(2):H435-46.
20. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal*. 1973;134(3):707-16.
21. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(4):677-83.
22. Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, Jopek A, Rudzinski P, Pillai R, et al. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(9):1614-20.
23. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research*. 2015;116(3):531-49.

24. Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free radical biology & medicine*. 2010;48(4):493-8.
25. Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang HD. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007; 292(6):H2997-3005.
26. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, et al. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 108(10):1513-22.
27. Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension*. 2010; 56(3):490-7.
28. Wang HD, Xu S, Johns DG, Du Y, Quinn MT, Cayatte AJ, et al. Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice. *Circulation research*. 2001; 88(9):947-53.
29. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. 2007;87(1):315-424.
30. Wu J, Xia S, Kalionis B, Wan W, Sun T. The role of oxidative stress and inflammation in cardiovascular aging. *BioMed research international*. 2014;2014:615312.
31. Byon CH, Heath JM, Chen Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox biology*. 2016;9:244-53.
32. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2014:360438.
33. Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circulation research*. 2004; 95(11):1075-81.

34. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, et al. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(7):1131-8.
35. Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*. 2003;41(5):1096-101.
36. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaces M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *British journal of pharmacology*. 1998; 125(6):1329-35.
37. Sousa T, Oliveira S, Afonso J, Morato M, Patinha D, Fraga S, et al. Role of H₂O₂ in hypertension, renin-angiotensin system activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II. *British journal of pharmacology*. 2012;166(8):2386-401.
38. Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Taylor WR. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. *Hypertension*. 2005;46(4):732-7.
39. Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*. 2006;6(1):1-19.
40. Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Griera M, Lopez-Ongil S, et al. The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Molecular pharmacology*. 2001;59(1):104-12.
41. Jin L, Ying Z, Webb RC. Activation of Rho/Rho kinase signalling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004; 287(4):H1495-500.
42. Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2004;44(2):200-8.
43. Burgoyne JR, Pryszyzhna O, Rudyk O, Eaton P. cGMP-dependent activation of protein kinase G precludes disulfide activation: implications for blood pressure control. *Hypertension*. 2012;60(5):1301-8.

44. Zhang DX, Borbouse L, Gebremedhin D, Mendoza SA, Zinkevich NS, Li R, et al. H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circulation research*. 2012;110(3):471-80.
45. Knock GA, Shaifta Y, Snetkov VA, Vowles B, Drndarski S, Ward JP, et al. Interaction between src family kinases and rho-kinase in agonist-induced Ca²⁺-sensitization of rat pulmonary artery. *Cardiovasc Res*. 2008;77(3):570-9.
46. Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, Shirao S, Miwa S, et al. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca(2+) sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circ Res*. 2002;91(10):953-60.
47. Oeckler RA, Kaminski PM, Wolin MS. Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidase-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. *Circ Res*. 2003;92(1):23-31.
48. Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*. 1999;3(5):629-38.
49. Mills JE, Whitford PC, Shaffer J, Onuchic JN, Adams JA, Jennings PA. A novel disulfide bond in the SH2 Domain of the C-terminal Src kinase controls catalytic activity. *J Mol Biol*. 2007;365(5):1460-8.
50. Roskoski R, Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(1):1-14.
51. Akhand AA, Pu M, Senga T, Kato M, Suzuki H, Miyata T, et al. Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J Biol Chem*. 1999;274(36):25821-6.
52. Giannoni E, Buricchi F, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol Cell Biol*. 2005;25(15):6391-403.
53. Gui P, Chao JT, Wu X, Yang Y, Davis GE, Davis MJ. Coordinated regulation of vascular Ca²⁺ and K⁺ channels by integrin signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2010;674:69-79.
54. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1994;74(6):1141-8.

55. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998;32(3):488-95.
56. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circulation research*. 2002;91(5):406-13.
57. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(4):489-95.
58. Rocic P, Govindarajan G, Sabri A, Lucchesi PA. A role for PYK2 in regulation of ERK1/2 MAP kinases and PI 3-kinase by ANG II in vascular smooth muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;280(1):C90-9.
59. Taniyama Y, Weber DS, Rocic P, Hilenski L, Akers ML, Park J, et al. Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(22):8019-29.
60. Adachi T, Pimentel DR, Heibeck T, Hou X, Lee YJ, Jiang B, et al. S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signalling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(28):29857-62.
61. Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, et al. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2004;287(2):C494-9.
62. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, et al. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(32):22699-704.
63. Rocic P, Seshiah P, Griendling KK. Reactive oxygen species sensitivity of angiotensin II-dependent translation initiation in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(38):36973-9.
64. Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signalling by reactive oxygen species. *Physiology*. 2006; 21:269-80.

65. Heesom KJ, Denton RM. Dissociation of the eukaryotic initiation factor-4E/4E-BP1 complex involves phosphorylation of 4E-BP1 by an mTOR-associated kinase. *FEBS letters*. 1999; 457(3):489-93.
66. Zima AV, Blatter LA. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular research*. 2006;71(2):310-21.
67. Ying J, Sharov V, Xu S, Jiang B, Gerrity R, Schoneich C, et al. Cysteine-674 oxidation and degradation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase in diabetic pig aorta. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(6):756-62.
68. Molkenkin JD. Calcineurin-NFAT signalling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular research*. 2004; 63(3):467-75.
69. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 1995; 270(5234):296-9.
70. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(8):3633-8.
71. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273(45):29864-72.
72. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9.
73. Nishio E, Watanabe Y. The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *British journal of pharmacology*. 1997; 121(4):665-70.
74. Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;285(3):669-74.
75. Lo IC, Shih JM, Jiang MJ. Reactive oxygen species and ERK 1/2 mediate monocyte chemotactic protein-1-stimulated smooth muscle cell migration. *Journal of biomedical science*. 2005;12(2):377-88.

76. Chen Z, Lee FY, Bhalla KN, Wu J. Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Molecular pharmacology*. 2006;69(5):1527-33.
77. Du J, Sperling LS, Marrero MB, Phillips L, Delafontaine P. G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;218(3):934-9.
78. Scheidegger KJ, Du J, Delafontaine P. Distinct and common pathways in the regulation of insulin-like growth factor-1 receptor gene expression by angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*. 1999;274(6):3522-30.
79. Du J, Brink M, Peng T, Mottironi B, Delafontaine P. Thrombin regulates insulin-like growth factor-1 receptor transcription in vascular smooth muscle: characterization of the signaling pathway. *Circ Res*. 2001;88(10):1044-52.
80. Ververis JJ, Ku L, Delafontaine P. Regulation of insulin-like growth factor I receptors on vascular smooth muscle cells by growth factors and phorbol esters. *Circ Res*. 1993;72(6):1285-92.
81. Le Roith D. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*. 1997;336(9):633-40.
82. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol*. 2001;21(1):26-38.
83. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*. 1995;16(2):143-63.
84. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
85. Azar ZM, Mehdi MZ, Srivastava AK. Activation of insulin-like growth factor type-1 receptor is required for H₂O₂-induced PKB phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2006;84(7):777-86.
86. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 1992;258(5082):607-14.

87. Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 1995;30(4):570-84.
88. Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ, Molkentin JD. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol.* 2002;156(5):905-19.
89. Gu X, Bishop SP. Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circulation research.* 1994;75(5):926-31. Epub 1994/11/01.
90. Braun MU, LaRosee P, Simonis G, Borst MM, Strasser RH. Regulation of protein kinase C isozymes in volume overload cardiac hypertrophy. *Molecular and cellular biochemistry.* 2004;262(1-2):135-43. Epub 2004/11/10.
91. Salamanca DA, Khalil RA. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochemical pharmacology.* 2005;70(11):1537-47.
92. Bowling N, Walsh RA, Song G, Estridge T, Sandusky GE, Fouts RL, et al. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation.* 1999;99(3):384-91.
93. Wang J, Liu X, Sentex E, Takeda N, Dhalla NS. Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2003;284(6):H2277-87.
94. Steinberg SF. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C. *Frontiers in Pharmacology.* 2015;6:128.
95. Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, et al. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol.* 2003;161(5):933-44.
96. Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, et al. Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circulation research.* 2004;94(9):1219-26.
97. Taniyama Y, Weber DS, Rocic P, Hilenski L, Akers ML, Park J, et al. Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions. *Molecular and cellular biology.* 2003;23(22):8019-29.

98. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, et al. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(9):2035-42.
99. Milbrandt J. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*. 1987; 238(4828):797-9.
100. Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG, Tsai-Morris CH. A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene research*. 1987;1(4):343-55.
101. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*. 1991; 252(5007):809-17.
102. Matheny C, Day ML, Milbrandt J. The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(11):8176-81.
103. Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 1995;50:191-224.
104. Burmeister SS, Fernald RD. Evolutionary conservation of the egr-1 immediate-early gene response in a teleost. *The Journal of comparative neurology*. 2005;481(2):220-32.
105. Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *Journal of cellular physiology*. 2002;193(3):287-92.
106. Christy B, Nathans D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(22):8737-41.
107. Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(23):16949-57.
108. Bhattacharyya S, Chen SJ, Wu M, Warner-Blankenship M, Ning H, Lakos G, et al. Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *The American journal of pathology*. 2008; 173(4):1085-99.

109. O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, Baraban JM. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends in neurosciences*. 1999; 22(4):167-73.
110. Meyer RG, Kupper JH, Kandolf R, Rodemann HP. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2002;269(1):337-46.
111. Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, Gaestel M, Neininger A. Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(28):19559-64.
112. Khachigian LM, Collins T. Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circulation research*. 1997;81(4):457-61.
113. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*. 1995;269(5222):403-7.
114. Kaufmann K, Bach K, Thiel G. The extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biological chemistry*. 2001;382(7):1077-81.
115. Cheyou ER, Youreva V, Srivastava AK. Involvement of the early growth response protein 1 in vascular pathophysiology: an overview. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2014;51(6):457-66.
116. Cheyou ER, Bouallegue A, Srivastava AK. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase- II in vasoactive peptide- induced responses and vascular biology. *Current vascular pharmacology*. 2014;12(2):249-57.
117. Iyoda T, Zhang F, Sun L, Hao F, Schmitz-Peiffer C, Xu X, et al. Lysophosphatidic acid induces early growth response-1 (Egr-1) protein expression via protein kinase Cdelta-regulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(27):22635-42.
118. Deguchi J, Makuuchi M, Nakaoka T, Collins T, Takuwa Y. Angiotensin II stimulates platelet-derived growth factor-B chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through Ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-Jun N-terminal protein kinase mechanisms. *Circulation research*. 1999; 85(7):565-74.

119. Youreva V, Srivastava AK. Early Growth Response Protein-1 Expression by Insulin-Like Growth Factor-1 Requires ROS-Dependent Activation of ERK1/2 and PKB Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(1):152-62.
120. Sanchez-Guerrero E, Midgley VC, Khachigian LM. Angiotensin II induction of PDGF-C expression is mediated by AT1 receptor-dependent Egr-1 transactivation. *Nucleic acids research*. 2008;36(6):1941-51.
121. Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Zhao L, Ahmad M, et al. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. *The Biochemical journal*. 2003;370(Pt 3):1019-25.
122. Yu HW, Liu QF, Liu GN. Positive regulation of the Egr-1/osteopontin positive feedback loop in rat vascular smooth muscle cells by TGF-beta, ERK, JNK, and p38 MAPK signalling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 396(2):451-6.
123. Santiago FS, Lowe HC, Kavurma MM, Chesterman CN, Baker A, Atkins DG, et al. New DNA enzyme targeting Egr-1 mRNA inhibits vascular smooth muscle proliferation and regrowth after injury. *Nature medicine*. 1999; 5(12):1438.
124. Liu C, Zhang X, Wang S, Cheng M, Liu C, Wang S, et al. Transfected early growth response gene-1 DNA enzyme prevents stenosis and occlusion of autogenous vein graft in vivo. *BioMed research international*. 2013;2013:310406.
125. Wu X, Cheng J, Li P, Yang M, Qiu S, Liu P, et al. Mechano-sensitive transcriptional factor Egr-1 regulates insulin-like growth factor-1 receptor expression and contributes to neointima formation in vein grafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(3):471-6.
126. Dickinson MG, Kowalski PS, Bartelds B, Borgdorff MA, van der Feen D, Sietsma H, et al. A critical role for Egr-1 during vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular research*. 2014;103(4):573-84.
127. McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, Bush H, Jr., et al. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(5):653-62.
128. Harja E, Bucciarelli LG, Lu Y, Stern DM, Zou YS, Schmidt AM, et al. Early growth response-1 promotes atherogenesis: mice deficient in early growth response-1 and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis and vascular inflammation. *Circulation research*. 2004;94(3):333-9.

129. Harja E, Chang JS, Lu Y, Leitges M, Zou YS, Schmidt AM, et al. Mice deficient in PKC β and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(4):1081-91.
130. Yan SF, Zou YS, Gao Y, Zhai C, Mackman N, Lee SL, et al. Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(14):8298-303.
131. Yan SF, Harja E, Andrassy M, Fujita T, Schmidt AM. Protein kinase C β /early growth response-1 pathway: a key player in ischemia, atherosclerosis, and restenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(9 Suppl 1):A47-55.
132. Zhou X, Richon VM, Wang AH, Yang XJ, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14329-33.
133. Gupta S, Davis RJ. MAP kinase binds to the NH₂-terminal activation domain of c-Myc. *FEBS letters*. 1994;353(3):281-5.
134. Nagayama K, Kyotani Y, Zhao J, Ito S, Ozawa K, Bolstad FA, et al. Exendin-4 Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Angiotensin II via the Inhibition of ERK1/2 and JNK Signaling Pathways. *PLoS one*. 2015;10(9):e0137960.
135. Braun MU, Mochly-Rosen D. Opposing effects of delta- and zeta-protein kinase C isozymes on cardiac fibroblast proliferation: use of isozyme-selective inhibitors. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35(8):895-903.
136. De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013:564961.
137. Khalil RA, Menice CB, Wang CL, Morgan KG. Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells. *Circulation research*. 1995;76(6):1101-8.

CHAPITRE 6

APPENDICES

Matériels et Méthodes

Anticorps et produits

Le H₂O₂ fut obtenu de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA) et les produits de culture cellulaire furent obtenus d'Invitrogen Corp. (Grand Island, New York, USA). SP600125 (inhibiteur de JNK), SB203580 (inhibiteur de la p38MAPK) Rō-31-8220 (inhibiteur de la PKC), Wortmannin (inhibiteur de la PI3-K) et SC-66 (inhibiteur de la PKB) furent obtenus de Calbiochem (San Diego, California, USA). Les anticorps Egr-1, β-tubuline et l'anticorps secondaire de lapin furent obtenus de Cell Signaling (Beverly, Massachusetts, USA). Le kit de détection de chimiluminescence (ECL) fut obtenu de Perkin Elmer (Montréal, Québec, Canada).

Culture cellulaire

Les CMLV A10 dérivées de l'aorte thoracique d'embryons de rats ont été maintenues en culture avec du *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% de pénicilline/streptomycine, dans une atmosphère de 5% de CO₂ à 37°C. Elles ont été cultivées deux fois par semaine en les récoltant avec de la trypsine/Éthylène Diamine Tétracétique (EDTA). Les cellules furent mises en état de dormance en les incubant 5 heures dans du DMEM exempt de sérum précédent le traitement au H₂O₂ et autres agents.

Lyse cellulaire et l'immunoblotting

Les CMLV A10 en dormance confluentes à 80% dans des pétris de 60-mm furent prétraitées en présence de différents agents pendant 30 min, suivi d'une stimulation à 100 μ M de H₂O₂ à différent temps d'exposition. Les cellules incubées en absence ou en présence des différents agents furent lavées trois fois avec du tampon phosphate salin 1X (PBS 1X) et lysées sur glace avec 100 μ l de tampon RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 0,5% Na-déoxycholate; 1% NP40; 0,1% dodécyl sulphate de sodium (SDS); 2 mM EDTA and 50 mM NaF) contenant un cocktail de trois inhibiteurs: le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), le cocktail d'inhibiteur de protéase (PIC) et l'orthovanadate (OV), tous dilués 1:100. Le lysat fut centrifugé à 13 000g pendant 10 minutes à 4°C. La concentration en protéine fut déterminée par la méthode Bradford. Des quantités égales de protéines furent sujettes à un gel d'électrophorèse à 7.5% sodium dodécyl sulphate polyacrylamide (SDS-PAGE), transférées sur des membranes de Polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Millipore, USA) et incubées *overnight* à 4°C avec les anticorps primaires Egr-1 (1:1000) et β -tubuline (1:5000). Le complexe antigène-anticorps fut détecté par un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort, la dilution utilisée dépendant de la dilution de l'anticorps primaire, et les bandes protéiques furent analysées par ECL. L'intensité des bandes fut quantifiée par une analyse densitométrique utilisant les programmes du logiciel *Quantity One Bio-Rad Corp. imaging* et *Graphpad Prism 5* (San Diego, California, USA).

Analyse par qRT-PCR

Une PCR quantitative en temps réel fut effectuée par SYBG (Life Technologies, Grand Island, NY) en utilisant 2 µl d'ADNc dans un volume final de 10 µl. L'amplification de la PCR en temps réel fut effectuée en utilisant le *7500 fast RT-PCR system* (Applied Biosystems, Grand Island, NY). L'expression de l'ARNm de l'Egr-1 fut estimée en utilisant les amorces suivantes: sens 5'-ctgcttcacgtcttctctctg-3' et antisens 5'-GTCAGTGTTGGGAGTAGGAAAG-3'. L'expression de l'ARNm de l'Egr-1 fut normalisée avec les niveaux d'ARNm de la β-actine en utilisant les amorces suivantes: sens 5'-TCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' et antisense 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGA-3'.

Statistiques

L'analyse statistique a été faite en utilisant une analyse de variance sur des mesures répétées (ANOVA *one-way*) suivi d'un test Tukey en utilisant le programme GraphPad Prism 5 (San Diego, California, USA). Toutes les données sont rapportées comme des moyennes ± SEM. Les différences entre les moyennes sont considérées significatives à $p < 0.05$.

Résultats

En plus des résultats présentés dans l'article (Chapitre 2), une série d'études fût également menée sur l'implication des autres membres de la famille des MAPK ainsi que la voie de signalisation de la PI3-K et de la PKB dans l'effet stimulant du H₂O₂ sur l'expression de l'Egr-1. Cependant, puisque ces données ont besoin d'être complétées par des expériences additionnelles, ces résultats se trouvent donc dans l'appendice (Fig 6.1 à 6.3). Brièvement, ces résultats montrent que l'inhibition pharmacologique de JNK par SP600125 bloque l'expression de l'Egr-1, tant au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm (Fig 6.1A et Fig 6.3), tandis que l'inhibition de la p38MAPK par SB203580 n'a aucun effet (Fig 6.1). De plus, l'inhibition de la PI3-K par la Wortmannin et de la PKB par SC-66 atténue presque complètement l'effet stimulant du H₂O₂ sur l'expression de l'Egr-1 (Fig 6.2).

Légendes des figures

Figure 6.1 Diminution de l'expression de l'*Early growth response protein-1* (Egr-1) induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par l'inhibiteur pharmacologique SP600125 (inhibiteur de JNK), mais pas par l'inhibiteur pharmacologique SB203580 (inhibiteur de la p38 MAPK) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) A10.

Des CMLV A10 confluentes et quiescentes ont été prétraitées avec (+) ou sans (-) 10 µM de SB203580 (inhibiteur de la p38MAPK) (A) ou de SP600125 (inhibiteur de JNK) (B) pendant 30 minutes suivi par une stimulation avec 100 µM de H₂O₂ pendant 60 minutes. Les lysats cellulaires ont été marqués à l'anticorps de l'Egr-1 (panneau supérieur) et également analysés pour connaître la quantité de protéines mise dans le gel en utilisant la β-tubuline (panneau du milieu). Le diagramme à barre (panneau du bas) représente les quantifications densitométriques de l'Egr-1 par rapport à la β-tubuline. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes et elles sont exprimées comme un rapport où les valeurs contrôles sont considérées comme 1. ** P<0.01 comparé au CTL; *** P<0.001 comparé au CTL; ## P<0.01 comparé aux CMLV traitées avec le H₂O₂ seul.

Figure 6.2 Diminution de l'expression de l'*Early growth response protein-1* (Egr-1) induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par les inhibiteurs pharmacologiques SC-66 (inhibiteur de la PKB) et Wortmannin (inhibiteur de la PI3-K) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) A10.

Des CMLV A10 confluentes et quiescentes ont été prétraitées avec (+) ou sans (-) 10 µM de SC-66 (inhibiteur de la PKB) (A) ou 100 nM de Wortmannin (inhibiteur de la PI3-K) (B) pendant 30 minutes suivi par une stimulation avec 100 µM de H₂O₂ pendant 60 minutes. Les lysats cellulaires ont été marqués à l'anticorps de l'Egr-1 (panneau supérieur) et également analysés pour démontrer la quantité égale de protéines mise dans le gel en utilisant la β-tubuline (panneau du milieu). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes et elles sont exprimées comme un rapport où les valeurs contrôles sont considérées comme 1. * P<0.05 comparé aux CMLV traitées avec le H₂O₂ seul; *** P<0.001 comparé au CTL; ** P<0.01 comparé aux CMLV traitées avec le H₂O₂ seul; ### P<0.001 comparé aux CMLV traitées avec le H₂O₂ seul.

Figure 6.3 Inhibition de l'expression de l'ARNm d'Egr-1 induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par l'inhibiteur pharmacologique SP600125 (inhibiteur de JNK) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Des CMLV A10 confluentes et quiescentes ont été prétraitées avec 10 µM de SP600125 (inhibiteur de JNK) pendant 30 minutes suivi par une stimulation avec 100 µM de H₂O₂ pendant 60 minutes. L'analyse des niveaux relatifs de l'ARNm de l'Egr-1 ont été obtenus par qRT-PCR. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM de trois expériences indépendantes et elles sont exprimées comme un rapport où les valeurs contrôles sont considérées comme 1. *** P<0.001 comparé au CTL; ** P<0.01 comparé aux CMLV traitées avec le H₂O₂ seul.

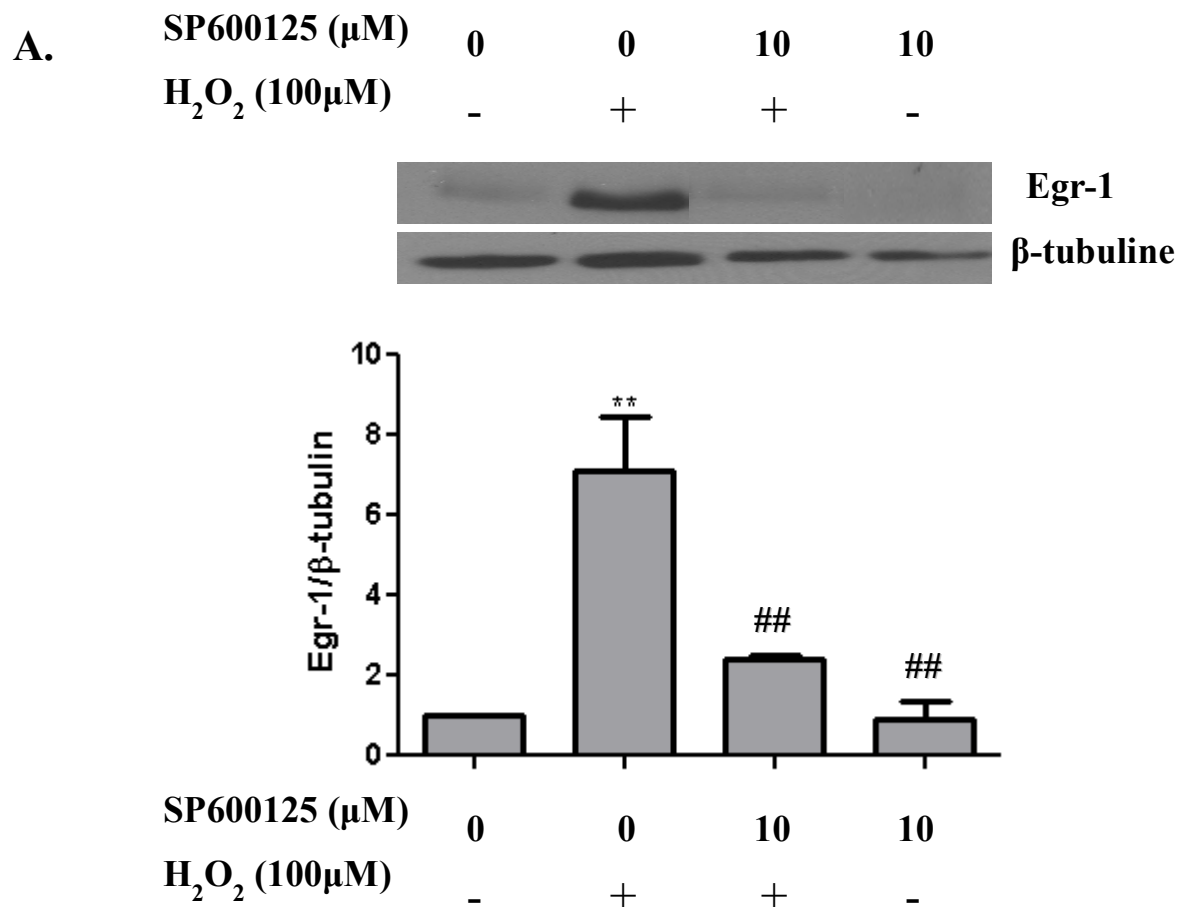


Figure 6.1

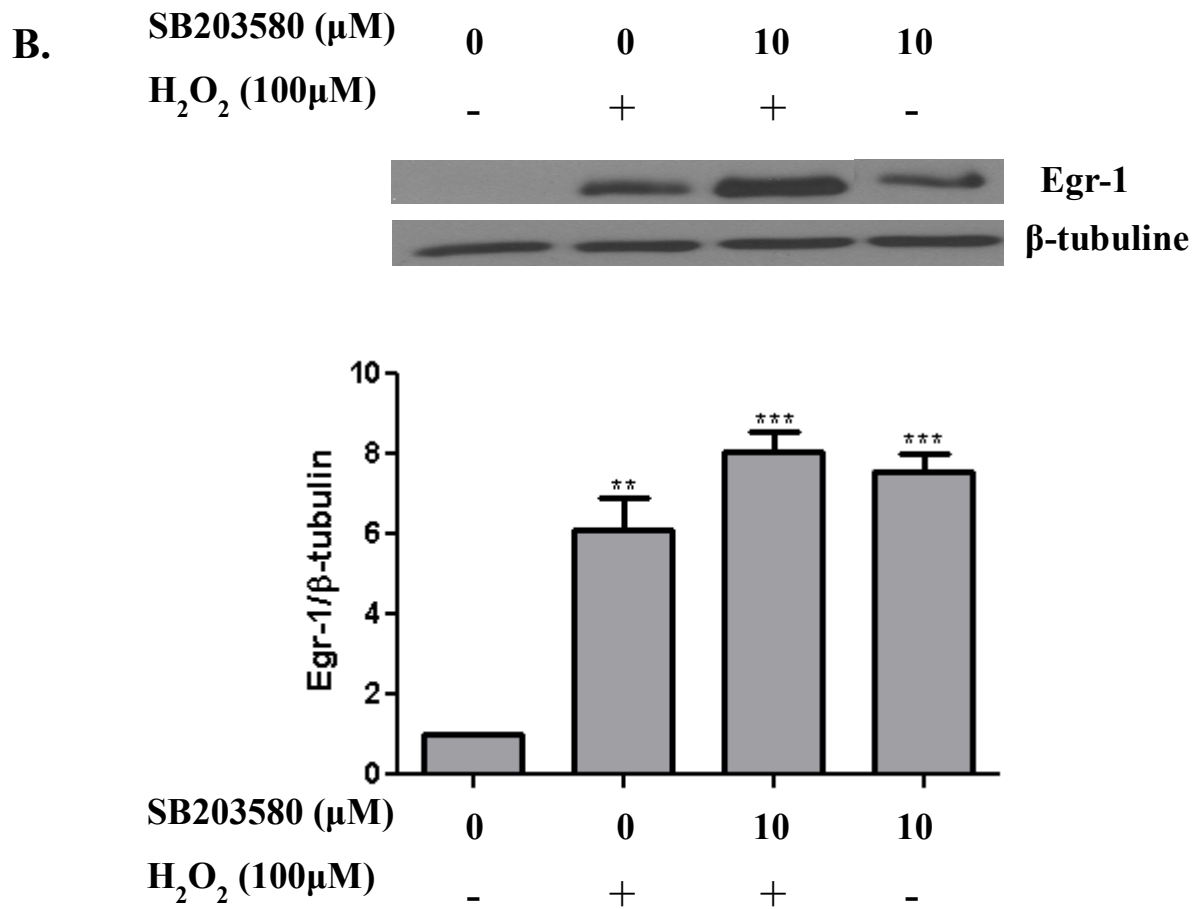


Figure 6.1

A.

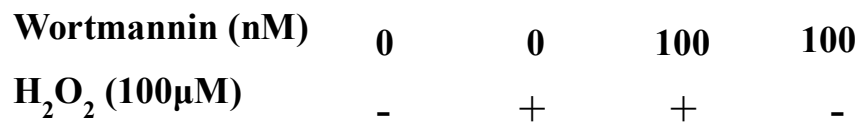
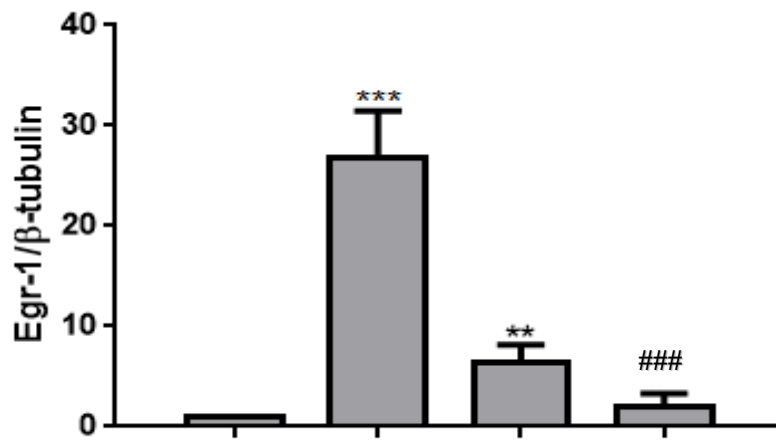
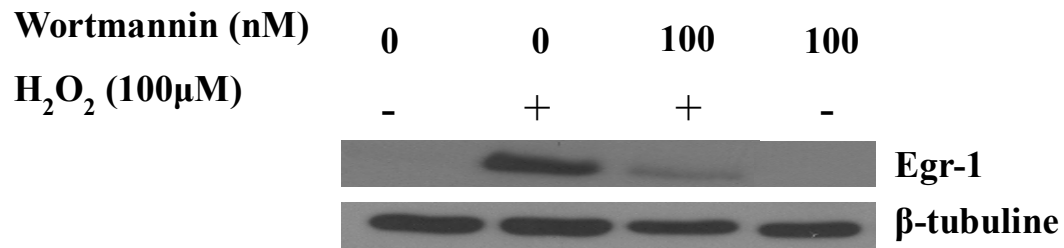


Figure 6.2

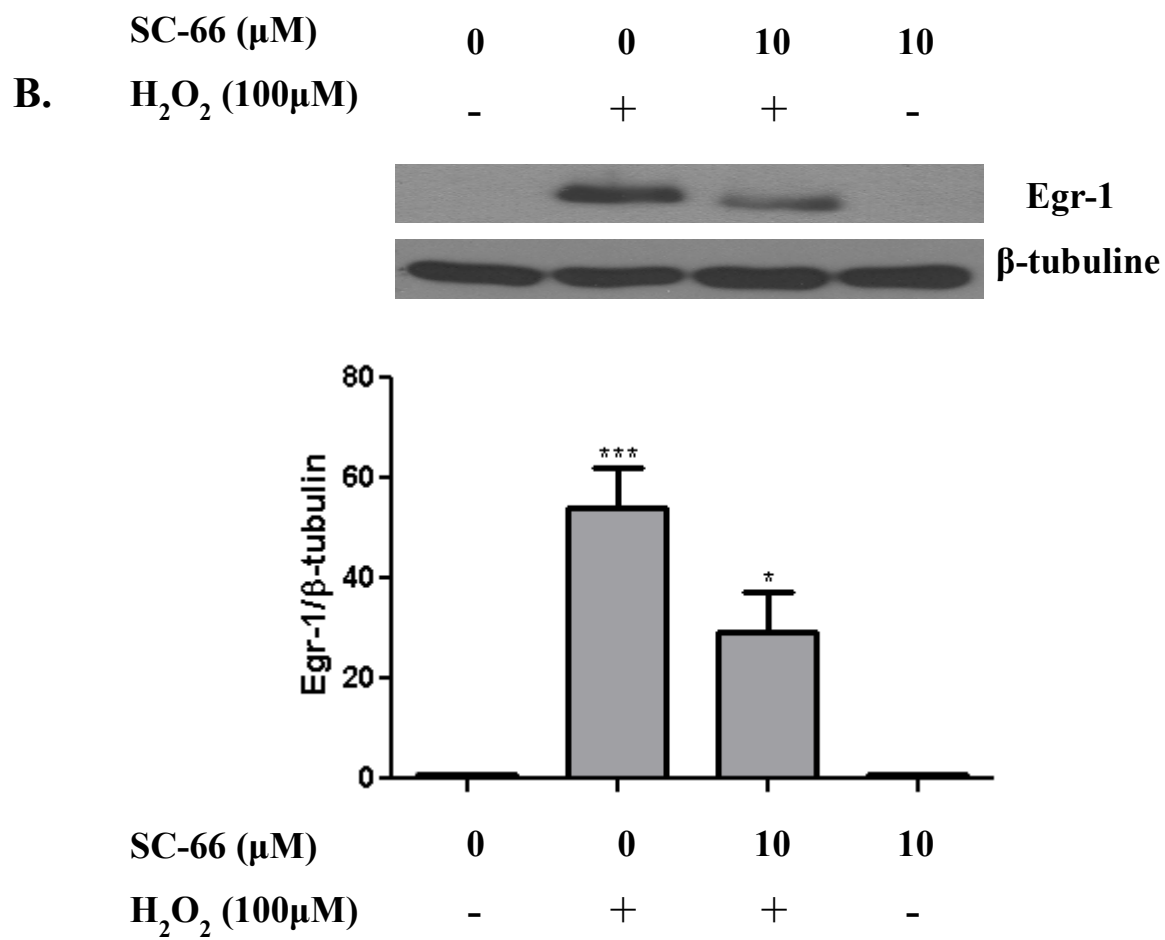


Figure 6.2

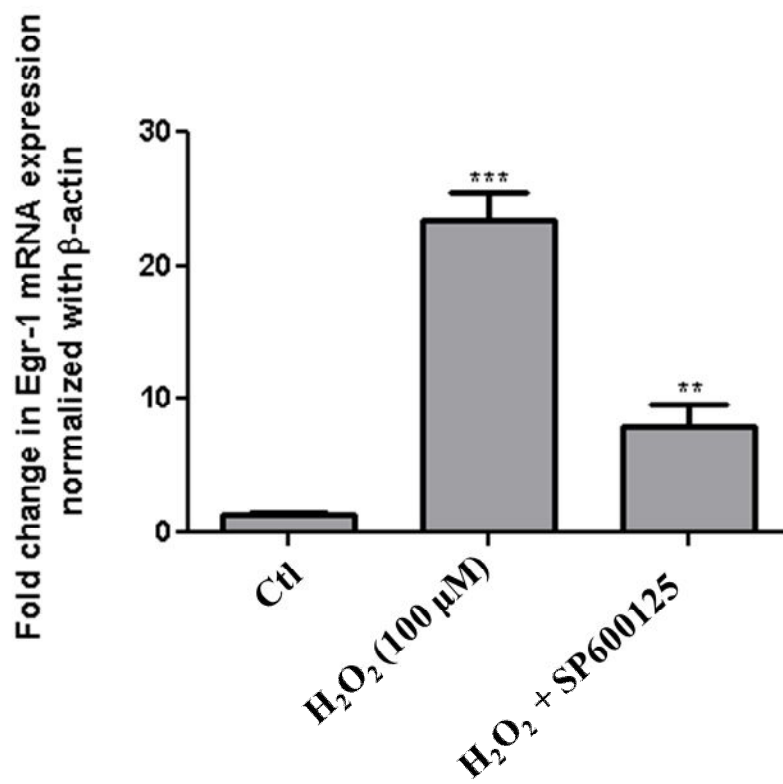


Figure 6.3