

Université de Montréal

**Inhibition de l'apoptose par inversion du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$:
preuve de l'existence de facteur(s) de transcription sensible(s) à
la $[\text{Na}^+]_i$ et rôle de la mortaline**

par

Sébastien Taurin

Département de Sciences Biomédicales
Vice-Décanat Recherche et Etudes Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Biomédicales

Février, 2003

© Sébastien Taurin, 2003



W

4

U58

2003

v.131

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Inhibition de l'apoptose par inversion du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$: preuve de l'existence de facteur(s) de transcription sensible(s) à la $[Na^+]_i$ et rôle de la mortaline

présentée par :
Sébastien Taurin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Ashok K. Srivastava	président-rapporteur
Dr Sergei N. Orlov	directeur de recherche
Dr Pavel Hamet	co-directeur
Dr Alexei V. Pshezhetsky	co-directeur
Dr John Chan	membre du jury
Dr Paul Isenring	examineur externe
Dre Jolanta Gutkowska	représentante du doyen de la FES

Thèse acceptée le 30 septembre 2003

SOMMAIRE

L'altération de la géométrie des vaisseaux sanguins, appelée remodelage vasculaire et caractérisée par un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose, est l'un des mécanismes potentiels du maintien à long terme d'une pression sanguine élevée. Les déterminants génétiques et moléculaires de ce processus sont mal compris. Toutefois, plusieurs types cellulaires provenant de rongeurs avec une hypertension expérimentale, dont les cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV), connaissent une altération de l'activité des transporteurs des ions monovalents et une augmentation de la production de facteur(s) endogène(s) apparenté(s) à la ouabaïne, inhibiteur de la Na^+, K^+ -ATPase.

Récemment, il a été démontré que l'inversion du rapport $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ intracellulaire, due à l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase des CMLV par la ouabaïne ou dans un milieu dépourvu de K^+ , et l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC inhibent l'apoptose en amont de l'activation de la caspase-3. Le travail présenté dans cette thèse a pour but d'étudier les mécanismes de ce phénomène.

Dans la première partie de notre étude, nous avons démontré qu'à la fois l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase et l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC aboutissent à l'induction de la synthèse d'ARN. Nous avons observé que les inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de la synthèse des protéines abolissent l'effet anti-apoptotique de la ouabaïne mais ne modifient pas l'effet de l'AMPC. Ces données suggèrent qu'au contraire de la voie de l'AMPC, l'inhibition de l'apoptose par un rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ élevé est due à l'expression *de novo* de gène(s) anti-apoptotique(s). Dans la seconde partie, nous avons proposé que l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase dans les CMLV traitées à la ouabaïne induise l'expression de gènes de réponse primaire (GRP). En fait, une augmentation du contenu en ARNm de c-Fos a été détectée. Nous avons démontré que l'expression de c-Fos est induite par une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ plutôt qu'une diminution de la $[\text{K}^+]_i$ et est indépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nous avons également observé que la ouabaïne n'affecte pas l'activation des éléments majeurs du promoteur du gène *c-fos*, suggérant l'existence de facteur(s) transcriptionnel(s) sensible(s) à la $[\text{Na}^+]_i$. Dans la troisième partie, nous avons utilisé une approche protéomique pour identifier des gènes anti-apoptotiques dont l'expression est induite par l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase. Un grand nombre de protéines

néosynthétisées sont détectées dans les CMLV traitées à la ouabaïne, en particulier la mortaline, membre de la superfamille des protéines de choc thermique. Nous avons démontré que de façon similaire à la ouabaïne, la transfection de la mortaline inhibe l'apoptose dans des CMLV privées de sérum, par l'intermédiaire de son interaction avec p53.

En conclusion, notre étude a permis l'identification d'un nouveau mécanisme de couplage excitation-transcription transmis par le Na^+_i , indépendant du Ca^{2+} , et aboutissant à l'expression de GRP et de plusieurs gènes de réponse tardive. Ces travaux ont permis d'identifier la mortaline comme un gène anti-apoptotique sensible au Na^+_i . La poursuite de cette étude permettra l'identification de facteur(s) sensible(s) à la $[\text{Na}^+]_i$, du rôle des facteurs endogènes apparentés à la ouabaïne et d'autres modulateurs du Na^+ intracellulaire impliqués dans le remodelage vasculaire.

Mots clés

Na^+, K^+ -ATPase ; $[\text{Na}^+]_i$; expression génique ; facteur de transcription sensible au Na^+_i ; mortaline, p53, remodelage vasculaire

SUMMARY

Alteration of blood vessel geometry or vascular remodeling, characterized, by an imbalance between cell proliferation and apoptosis, is one of the potent mechanisms of long-term maintenance of elevated blood pressure. The genetic and molecular determinants of this process are still poorly understood. It is known, however, that several types of cultured cells from rodents with genetic spontaneous hypertension, including vascular smooth muscle cells (VSMC), exhibit enhanced proliferation, time-scheduled “apoptotic windows”, altered activity of monovalent ion carriers, and augmented production of endogenous ouabain-like inhibitor(s) of Na^+ , K^+ -ATPase. Recently, it was shown that inversion of the intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio under inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase with ouabain or in K^+ -depleted medium with activation of the cAMP signaling system inhibited VSMC apoptosis; both stimuli prevented development of the apoptotic machinery at a step upstream of caspase-3. The work presented here has been designed to explore the mechanisms of this phenomenon.

In the first part of our study, we demonstrated that Na^+ , K^+ -ATPase inhibition and activation of cAMP signaling augmented of RNA synthesis. We also observed that inhibitors of RNA and protein synthesis abolished the antiapoptotic effect of ouabain, but did not modify protection from apoptosis by cAMP signaling. These data allowed us to conclude that in contrast to cAMP signaling, inhibition of apoptosis by elevated $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio is mediated by the *de novo* expression of antiapoptotic gene(s). Keeping in mind the sharp elevation of RNA synthesis in ouabain-treated VSMC, we proposed that inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase triggers the expression of early response genes (ERG). This hypothesis was explored in *the second part* of our study. Indeed, a 3-fold increase of c-Fos mRNA content was detected after 30-min incubation of VSMC with ouabain. We demonstrated that c-Fos expression was triggered by elevation of $[\text{Na}^+]_i$ rather than by depletion of $[\text{K}^+]_i$ and was not caused by alteration of pH_i , cell volume, and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. We also observed that the effect of serum and ouabain on c-Fos expression was additive. In contrast to serum, ouabain failed to activate the major elements of the *c-fos* gene promoter, suggesting the existence of new $[\text{Na}^+]_i$ -sensitive transcriptional factor(s). *In the third part*, we employed proteomics to identify antiapoptotic genes whose expression is triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition.

Almost one hundred newly-synthesized protein spots were detected by 2D-electrophoresis of ouabain-treated VSMC. 25 newly synthesized proteins were identified by nano-LC-MS-MS analysis, including mortalin, a member of the heat shock protein superfamily. We demonstrated that similarly to ouabain, transfection with mortalin inhibited apoptosis in serum-deprived VSMC via its interaction with p53.

In conclusion, our study identified a novel Na^+ -mediated, Ca^{2+} -independent mechanism of excitation-transcription coupling leading to the expression of ERG and dozens of late response genes. It also identified mortalin as a $[\text{Na}^+]_i$ -sensitive gene whose augmented expression rescued VSMC from apoptosis. Continuation of this study could identify a $[\text{Na}^+]_i$ -sensor and a role of endogenous ouabain-like substances as well as other modulators of $[\text{Na}^+]_i$ handling in vascular remodeling.

Key words

Na^+, K^+ -ATPase ; $[\text{Na}^+]_i$; gene expression ; Na^+_i -sensitive transcription factor ; mortalin, p53, vascular remodeling

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	v
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS	xvii
REMERCIEMENTS	xxii

CHAPITRE 1-INTRODUCTION

<i>1.1 La Na⁺, K⁺-ATPase : observation initiale et propriétés générales</i>	2
1.1.1 La Na⁺, K⁺-ATPase : membre des ATPases de type P	2
1.1.2. Histoire d'une découverte	5
1.1.3. Propriétés générales de la Na⁺, K⁺-ATPase	5
<i>1.2 Biologie moléculaire de la Na⁺, K⁺-ATPase</i>	9
1.2.1 Structure des sous-unités α et β de la Na⁺, K⁺-ATPase	9
1.2.1.1 Structure de la sous-unité α	11
1.2.1.2 Structure de la sous-unité β	12
1.2.2 Mécanisme du flux ionique ou mécanisme d'Albers-Post	13
1.2.3 Isoformes α et β	16
1.2.3.1 Isoformes α	16
1.2.3.2 Isoformes β	18
1.2.3.3 Propriétés enzymatiques et signification physiologique des isoformes.....	19
1.2.4 Particularité de la sous-unité $\alpha 1$ de rongeur	25
<i>1.3 Régulation de la Na⁺, K⁺-ATPase</i>	26

1.3.1 Régulation de l'activité de la Na⁺, K⁺ ATPase par le Na⁺ intracellulaire et l'ATP	26
1.3.2 Régulation de l'activité de la Na⁺, K⁺ ATPase par l'intermédiaire de récepteurs	28
1.3.3 Régulation de l'activité de la Na⁺, K⁺ ATPase par des intermédiaires des voies de signalisations intracellulaires	30
1.3.3.1 Ca ²⁺ intracellulaire.....	30
1.3.3.2 La protéine kinase activée par l'AMPc (PKA).....	31
1.3.3.3 La protéine kinase C (PKC).....	32
1.3.3.4 Protéines du cytosquelette.....	33
1.3.3.5 Inhibiteurs circulants de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPase.....	35
1.3.3.6 Autres effecteurs.....	36
1.4 Rôle de la Na⁺, K⁺-ATPase dans la fonction de la cellule	37
1.4.1 Electrogénicité de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPase.....	37
1.4.2 Régulation du volume cellulaire.....	39
1.4.3 Prolifération cellulaire et mort cellulaire.....	42
1.4.4 Expression des gènes et voies intracellulaires de signalisation.....	49
1.5 Implication dans la pathogenèse de l'hypertension	55
1.6 Hypothèse et objectifs du travail de recherche	59

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis.....	61
Abstract.....	63
Introduction.....	64
Materials and Methods.....	66
Results.....	68
Discussion.....	70
Acknowledgements.....	71
References.....	72

Tableaux et figures.....	75
Résumé.....	84

CHAPITRE 3 : ARTICLE 2

c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells from rat aorta : evidence for an intracellular- sodium- mediated, calcium-independent mechanism.....	86
Summary.....	88
Introduction.....	89
Methods.....	92
Results.....	98
Discussion.....	103
Acknowledgements.....	105
References.....	106
Tableau et figures.....	113
Résumé.....	134

CHAPITRE 4 : ARTICLE 3

Proteome analysis and fonctionnal expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells.....	136
Summary.....	138
Introduction.....	139
Materials and Methods.....	140
Results.....	142
Discussion.....	146
Acknowledgements.....	148
References.....	149

Tableau et figures.....	156
Résumé.....	170

CHAPITRE 5- DISCUSSION

<i>5.1 Inhibition de l'apoptose par la voie de signalisation de l'AMPC et par l'élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$: preuve de deux voies distinctes.....</i>	<i>173</i>
<i>5.2 Expression de la protéine c-Fos et preuve de l'existence d'un élément sensible au Na^+.....</i>	<i>174</i>
<i>5.3 Protéines dont l'expression est modifiée par l'inhibition de la Na^+, K^+-ATPase.....</i>	<i>180</i>
<i>5.4 La mortaline, gène anti-apoptotique.....</i>	<i>183</i>
<i>5.5 Conclusion.....</i>	<i>187</i>
<i>5.6 Perspectives de recherche.....</i>	<i>191</i>

BIBLIOGRAPHIE.....	195
---------------------------	------------

ANNEXE I.....	xxiii
ANNEXE II.....	xxv
ANNEXE III.....	xxvii
ANNEXE IV.....	xxix
ANNEXE V.....	xxxi

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1-INTRODUCTION

Tableau I : Les différents types d'ATPase rencontrés chez les Procaryotes et les Eucaryotes.....	3
Tableau II : Localisation des gènes codant pour les sous-unités α et β de la Na^+ , K^+ -ATPase.....	17
Tableau III : Caractéristiques cinétiques de la Na^+ , K^+ -ATPase de rat et d'humain.....	21
Tableau IV : Gènes dont l'expression est augmentée lors de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase.....	50
Tableau V : Données sur l'implication de la Na^+ , K^+ -ATPase dans la signalisation intracellulaire.....	54

CHAPITRE 2-ARTICLE 1

Tableau I : Effect of actinomycin D and cycloheximide on synthesis of RNA and protein and viability of VSMC transfected with E1A adenovirus.....	81
Tableau II : Effect of forskolin, actinomycin D, and cycloheximide on apoptosis in VSMC-E1A measured by accumulation of intracellular chromatin fragments.....	82
Tableau III : Effect of forskolin, actinomycin D and cycloheximide on the activity of caspase-3 measured in VSMC-E1A cells.....	83

CHAPITRE 3-ARTICLE 2

Tableau I : Effect of ouabain, serum, isoproterenol and endothelin-1
on the activity of transcription factors in vascular smooth muscle cells
(VSMC).....133

CHAPITRE 4-ARTICLE 3

Tableau I : VSMC proteins altered by ouabain treatment.....168

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1-INTRODUCTION

Figure 1 : La Na^+ , K^+ -ATPase et les autres transporteurs ioniques dans une cellule animale typique.....8

Figure 2 : Représentation de la structure des sous unités de la Na^+ , K^+ -ATPase rénale de cochon et de leurs modifications post-traductionnelles ($\alpha 1$, $\beta 1$).....10

Figure 3 : Schéma de la réaction d'Albers-Post illustrant le cycle de la Na^+ , K^+ -ATPase.....14

Figure 4 : Représentation schématique des protéines interagissant directement ou indirectement avec la Na^+ , K^+ -ATPase.....34

Figure 5 : Schéma représentant les systèmes majeurs impliqués dans l'induction et la progression de l'apoptose.....45

CHAPITRE 2-ARTICLE 1

Figure 1 : Kinetics of accumulation of intracellular chromatin fragments in VSMC transfected with E1A-adenovirus and incubated in growth factor medium.....75

Figure 2 : Effect of forskolin on protein phosphorylation in VSMC transfected with E1A adenovirus.....77

Figure 3 : Possible mechanisms of involvement of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ and cAMP in the inhibition of apoptosis in VSMC.....	79
---	----

CHAPITRE 3-ARTICLE 2

Figure 1 : Effect of ouabain on early response gene (ERG) expression in quiescent vascular smooth muscle cells (VSMC).....	113
---	-----

Figure 2 : Effect of ouabain and potassium-depleted medium on the expression of c-Fos protein in quiescent VSMC.....	115
---	-----

Figure 3 : Effect of ouabain on Na^+-K^+ pump, $[Na^+]_i$ and $[K^+]_i$ and expression of c-Fos protein in quiescent VSMC.....	117
---	-----

Figure 4 : Ouabain-induced modulation of $[Na^+]_i$, and $[K^+]_i$ and the c-Fos/S18 ratio.....	119
---	-----

Figure 5 : Role of cell volume in c-Fos expression.....	121
---	-----

Figure 6 : Effect of nicardipine (0.1 μ M) on c-Fos protein expression after incubation of VSMC for 6h in control and high-potassium media.....	123
--	-----

Figure 7 : $[Ca^{2+}]_i$ in control and ouabain-treated cells.....	125
--	-----

Figure 8 : Effect of ouabain on c-Fos protein expression in calcium- free medium and in BAPTA-loaded VSMC.....	127
---	-----

Figure 9 : Effect of serum on c-Fos mRNA (A) and protein (B) expression.....	129
--	-----

Figure 10 : Additive effect of serum and ouabain on c-Fos expression.....	131
---	-----

CHAPITRE 4-ARTICLE 3

- Figure 1 : Composite 2DE maps of soluble and membrane VSMC proteins showing changes in protein expression after the ouabain treatment.....156
- Figure 2 : Tandem mass spectra obtained from nano-LC-MS-MS analysis of mortalin (spot 2, Table).....158
- Figure 3 : Induction of mortalin in ouabain-treated VSMCs.....160
- Figure 4 : Detection of mortalin in VSMC-E1A cells transfected with mortalin cDNA by Western blot.....162
- Figure 5 : Delay of apoptosis in VSMC-E1A cells transfected with mortalin cDNA.....164
- Figure 6 : Expression of p53 in mortalin-transfected VSMCs.....166

CHAPITRE 5-DISCUSSION

- Figure 1 : Implications potentielles d'une augmentation de la $[Na^+]_i$ sur l'expression de *c-fos*.....176
- Figure 2 : Représentation schématique de la structure du promoteur de *c-fos*...179
- Figure 3 : Représentation schématique de la structure des différentes protéines de choc thermique.....184

Figure 4 : Représentation schématique des voies de signalisation possibles impliquant une augmentation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ou de l'AMPC et aboutissant à l'inhibition de l'apoptose dans des cellules de muscles lisse vasculaire.....190

Figure 5 : Etude du promoteur de c-fos : identification de l'élément sensible au Na^+_i193

Figure 6 : Identification de facteurs sensibles à l'augmentation de la Na^+_i194

LISTE DES ABREVIATIONS

$[Ca^{2+}]_{cyt}$	Concentration en ion Ca^{2+} cytosolique
$[Ca^{2+}]_i$	Concentration intracellulaire en Ca^{2+}
$[K^+]_i$	Concentration intracellulaire en K^+
$[Na^+]_{cyt}$	Concentration en ion Na^+ cytosolique
$[Na^+]_i$	Concentration intracellulaire en Na^+
ACT	Activateur
ACT~P	Activateur phosphorylé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AE	Aucun effet
AIF	« Apoptosis inducing factor »
Ala ou A	Alanine
AMOG	Molécule d'adhésion sur les glia
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ANF	Facteur natriurétique atrial
AP-1	Facteur de transcription « activator protein 1 »
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique transfert
Asn ou N	Asparagine
Asp ou D	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
BAPTA	Acide [1,2-bis(o-Amino-5-bromophenoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique
C	Cytosine
Ca^{2+} -ATPase	Adénosine triphosphatase stimulée par le Ca^{2+}
CAD	DNase activée par les caspases
CaM kinase	Kinase dépendante de la calmoduline

Caspase	Cysteinyl aspartate-protéinase spécifique
Cext	Extrémité C terminale dirigée vers l'extérieur
CI ₅₀	Constante d'inhibition de l'activité enzymatique
Cint	Extrémité C terminale dirigée vers l'intérieur
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
CRE	Élément de réponse au Ca ²⁺ /AMPC
Cys ou C	Cystéine
DA	Domaine d'activation de la transcription de la protéine de levure Gal4
DAG	Diacylglycérol
DARPP-32	Phosphoprotéine de 32 kDa régulée par l'AMPC et la dopamine
DISC	« Death-inducing signaling complex »
DNA-BD	Domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure Gal4
Domaine A	Domaine d'ancrage
Domaine N	Domaine nucléotidique
Domaine P	Domaine de phosphorylation
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermal
EGTA	Acide [éthylèneglycol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tétraacétique
eIF2	Facteur d'initiation de la traduction eucaryotique
EIPA	5-N-ethyl-N-isopropyl amiloride
E _K	Potentiel d'équilibre du K ⁺
E _{Na}	Potentiel d'équilibre du Na ⁺
Ep	Potentiel membranaire
Erg-1	Facteur de croissance «early growth response gene 1»
ERK1/2	« Extracellular signal regulated kinase » 1 et 2
ESNa	Élément du promoteur sensible au Na ⁺
FADD	« Fas associated death domain »
FEAO	Facteur endogène apparenté à la ouabaïne

FIHC	Facteur induit par les hormones corticostéroïdiennes
G	Guanine
GDP	Guanosine diphosphate
Gln ou Q	Glutamine
Glu ou E	Glutamate
Gly ou G	Glycine
Grb-2	« Growth factor receptor-bound protein 2 »
GRP	Gène de réponse primaire
GRP75	Protéine de 75 kDa régulée par le glucose
GRP78	Protéine de 78 kDa régulée par le glucose
GRP94	Protéine de 94 kDa régulée par le glucose
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺ , K ⁺ -ATPase	Adénosine triphosphatase stimulée par le H ⁺ et le K ⁺
HEK 293	Cellules rénales embryonnaires humaines 293
His ou H	Histidine
Hsc70	« Heat shock cognate 71 kDa protein »
Hsp27	Protéine de choc thermique de 27 kDa
Hsp40	Protéine de choc thermique de 40 kDa
Hsp47	Protéine de choc thermique de 47 kDa
Hsp70	Protéine de choc thermique de 70 kDa
Hsp90	Protéine de choc thermique de 90 kDa
IAF	Eosine, 5-iodoacétamidofluorescéine
ICAD	Inhibiteur de la DNase activée par les caspases
Ile ou I	Isoleucine
IMCD-3	Cellule épithéliale des canaux collecteurs de souris
INH	Inhibiteur
INH~P	Inhibiteur phosphorylé
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K _D	Constante de dissociation
K _m	Constante de Michaelis-Menten

Leu ou L	Leucine
Lys ou K	Lysine
M	Segment transmembranaire de la Na ⁺ , K ⁺ -ATPase
MAPKs	« Mitogen activated protein kinases »
MDCK	Cellules provenant du rein de chien Madin-Darby
Met ou M	Méthionine
MLC-2	Myosine chaîne légère-2
mot-1	Mortaline-1
mot-2	Mortaline-2
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	Adénosine triphosphatase stimulée par le Na ⁺ et le K ⁺
Next	Extrémité N terminale dirigée vers l'extérieur
NF-1	Élément de liaison au facteur nucléaire-1
NF-1BP	Facteur de liaison à NF-1
NF-κ B	Facteur nucléaire kappa B
NH ₄ ⁺	Ion ammonium
Nint	Extrémité N terminale dirigée vers l'intérieur
PBP74	Protéine liant les peptides de 74 kDa
PEK	Kinase pancréatique du facteur eIF2
Phe ou F	Phénylalanine
pH _i	pH intracellulaire
PI3 Kinase	Kinase dépendante du phosphatidylinositol triphosphate
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase dépendante du GMPc
PLA2	Phospholipase A2
PO ₄ ³⁻	Ion phosphate
PP1	Protéine phosphatase-1
PP2B	Protéine phosphatase-2B
Pro ou P	Proline
Protéine kinase src	Protéine kinase du sarcome de souris

QTL	« Quantitative trait loci »
Rat SHR	Rat spontanément hypertendu
RAV	Régulation de l'augmentation du volume
Rb	Rétinoblastome
RDV	Régulation de la diminution du volume
RE/S	Réticulum endoplasmique/sarcoplasmique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
S	"Senseur" de l'élévation de la $[Na^+]_i$
Ser ou S	Sérine
SERCA	Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique/ sarcoplasmique
SO_4^{2-}	Ion sulfate
SRE	Elément de réponse au sérum
SRF	Facteur de réponse au sérum
tBid	Protéine Bid tronquée
TGF β	« Transforming growth factor β »
Thr ou T	Thréonine
Trp ou W	Tryptophane
Tyr ou Y	Tyrosine
Val ou V	Valine
VDAC	Canal anionique sélectif dépendant du voltage
WKY	Wistar Kyoto

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Sergei N. Orlov pour m'avoir ouvert de nouveaux horizons, pour m'avoir consacré de son temps, de ses connaissances et de sa passion au cours de ces dernières années.

Je remercie également le Dr Pavel Hamet pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche, pour ses conseils et pour son soutien académique. Je lui en sais gré.

Je voudrais aussi exprimer toute ma reconnaissance au Dr Alexei V. Pshezhetsky pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils judicieux et pour m'avoir permis d'approcher le monde de la protéomique.

Je souhaiterais également remercier tous les membres des laboratoires du Dr Sergei N. Orlov et du Dr Pavel Hamet ainsi que du laboratoire du Dr Johanne Tremblay et plus particulièrement Mme Monique Poirier pour son aide, sa patience et sa disponibilité au cours de ces années.

Ces remerciements s'adressent également aux membres du laboratoire du Dr Alexei V. Pshezhetsky et plus spécialement au Dr Volkan Seyrantepe avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je remercie également tous les étudiants pour les moments que l'on a partagé et que j'espère que l'on continuera.

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La Na⁺, K⁺-ATPase : biologie moléculaire, régulation et implication dans la fonction de la cellule.

Récemment, Orlov et ses collaborateurs ont découvert qu'une inhibition prolongée de la Na^+ , K^+ -ATPase diminue l'apoptose dans les cellules muscle lisse vasculaire (CMLV) de (306). Notre étude a été élaborée afin d'étudier les mécanismes responsables de l'inhibition du processus apoptotique. En considérant le but de notre étude, dans ce chapitre, nous avons analysé les différentes propriétés de la Na^+ , K^+ -ATPase.

1.1 La Na^+ , K^+ -ATPase : observation initiale et propriétés générales.

1.1.1 La Na^+ , K^+ -ATPase : membre des ATPases de type P

Les ATPases de type P regroupent une famille importante d'enzymes homologues d'origine procaryotique et eucaryotique qui sont toutes impliquées dans le transport actif de cations tels que le K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ainsi que de phospholipides à travers la membrane plasmique (124, 87). Ces enzymes se caractérisent par un cycle de phosphorylation-déphosphorylation lors du processus de translocation des ions et des phospholipides ; c'est à dire la formation d'une liaison covalente, entre un résidu aspartate et un résidu phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP), intermédiaire dans le cycle catalytique. Ces ATPases ont également une organisation topologique membranaire identique et plusieurs domaines protéiques très conservés (245). Une comparaison des séquences d'acides aminés déduites a permis de répartir ces ATPases de type P en 5 types majeurs comportant chacun des isoformes multiples (tableau I, page 3). Les types I-A, II-D et III sont spécifiques aux procaryotes, aux champignons ou aux plantes (396). Parmi, les 200 membres identifiés de la famille des ATPases de type P, seules les isoenzymes Na^+ , K^+ -ATPase et H^+ , K^+ -ATPase d'origine animale et la Kdp-ATPase bactérienne, comportent en plus de la sous-unité catalytique, respectivement une ou deux sous-unités qui sont obligatoires pour l'activité des enzymes (125).

Tableau I : les différents types d'ATPase rencontrés chez les Procaryotes et les Eucaryotes

Type	Sous-type	Spécificité	Origine	Localisation	Nombre de sous-unités	Isoformes	Stoechiométrie
I	IA	K ⁺ -ATPase	Procaryote	Membrane	3 sous-unités (KDP A, B, C)		2 K ⁺
	IB	Cu ²⁺ -ou Cd ²⁺ -ATPase	Procaryote /Eucaryote	Réseau Golgi et membrane	Monomère	Cu ²⁺ -ATPase : 6 isoformes	? Cu ²⁺
						Cd ²⁺ ATPase : plusieurs isoformes	1 Cd ²⁺ /2H ⁺
	IIA	Ca ²⁺ -ATPase (SERCA)	Eucaryote	Réticulum sarcoplasmique/endoplasmique	Monomère associé à la phospholamban	3 isoformes comportant chacune plusieurs variants	2 Ca ²⁺ /2 H ⁺
SERCA1 : 2 variants (a, b) SERCA2 : 2 variants (a, b) SERCA3 : 3 variants (a, b, c)							
IIB	Ca ²⁺ -ATPase (PMCA)	Eucaryote	Membrane	Monomère	4 isoformes (PMCA 1-4) avec chacune de 6 à 8 variants.	2 Ca ²⁺ /1 à 2 H ⁺	
II	IIC	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	Eucaryote	Membrane	3 sous-unités (α, β, γ)	4 isoformes α (α1-4) dont α1 peut exister sous la forme de 2 variants	3Na ⁺ /2K ⁺
						3 isoformes β (β1-3)	
						Gastrique: 1 sous-unité α et 1 sous-unité β spécifique, insensible à la ouabaine Non gastrique : 1 sous-unité α et 1 sous-unité β spécifique, sensible à la ouabaine	2H ⁺ /2K ⁺
IID	Na ⁺ -ou Ca ²⁺ -ATPase de levure	Eucaryote	Membrane	Monomère	Plusieurs isoformes	2 Ca ²⁺ /1 à 2 H ⁺ et Na ⁺ /H ⁺	

III	IIIA	H ⁺ -ATPase	Procaryote Eucaryote (plante et levure)	Membrane	Monomère	Au moins 3 isoformes chez les plantes	
	IIIB	Mg ²⁺ -ATPase	Procaryote	Membrane	Monomère	2 isoformes (type 1 et 2)	? Mg ²⁺
IV		Phospholipide translocase	Eucaryote	Réticulum endoplasmique	Monomère		
V		ATPase n'ayant aucune spécificité définie	Eucaryote		Monomère		

D'après Moller et al, 1996 (322), Palmgren et Axelsen, 1998 (366), Komatsu et al, 2000 (248), Takeyasu et al, 2001(462),

1.1 2. Histoire d'une découverte

En 1902, Overton E. (312) fut le premier à suggérer l'existence d'un mécanisme de régulation des concentrations en K^+ et en Na^+ pour expliquer les cycles de contraction des cellules du muscle cardiaque. La notion de pompe à Na^+ a été pour la première fois introduite par R. Dean dans un article publié en 1941 pour expliquer la redistribution des cations (Na^+ et K^+) contre leur gradient de concentration dans les muscles après une période d'exercice ou une exposition au froid (83). Un lien possible entre les mouvements actifs du Na^+ et du K^+ a été suggéré par la suite dans des globules rouges humains, des muscles de grenouille et des axones de nerf d'invertébrés en observant que l'efflux de Na^+ était réduit lorsque la concentration extracellulaire en K^+ était diminuée (153, 207, 164). La similitude des pompes provenant de tissus différents a pu être établie après des travaux réalisés par Schatzmann qui découvrit que la ouabaïne, également appelée strophanthine, un glycoside d'origine végétale, inhibe la réabsorption du K^+ et l'expulsion du Na^+ des globules rouges exposés au froid sans affecter leur consommation d'oxygène ou la production d'acide lactique (358). Par la suite, des expériences réalisées par Gárdos ont permis de démontrer que l'ATP alimente la pompe (119). Des expériences réalisées sur des nerfs de crabe par Jens Cristian Skou ont pu démontrer l'existence d'une activité ATPase dépendante du Mg^{2+} , localisée sur la membrane plasmique, stimulée par la présence de Na^+ et de K^+ et dont l'activité était inhibée par la ouabaïne (379). La stoechiométrie de l'échange était de $3Na^+ : 2K^+$ (328). D'autres travaux ont permis de retrouver cette enzyme dans la membrane des globules rouges humains (330), puis dans le cerveau et le rein de mammifères (78) et par la suite de démontrer le caractère ubiquitaire de cette enzyme chez les animaux.

1.1.3. Propriétés générales de la Na^+, K^+ -ATPase

L'adénosine triphosphatase stimulée par le Na^+ et le K^+ (EC 3.6.1.37, maintenant EC 3.6.3.9) ou Na^+, K^+ -ATPase est un complexe protéique membranaire ubiquitaire composé généralement de deux sous-unités (α et β); une troisième sous-unité γ est retrouvée spécifiquement dans le rein (400). La Na^+, K^+ -ATPase est retrouvée chez tous les

membres du règne animale et possède l'unique propriété d'être inhibée par les glycosides, tels que la ouabaïne, élaborés comme poison par quelques plantes et animaux (389). La Na^+ , K^+ -ATPase est exprimée en abondance dans des tissus excitables (le cerveau, le muscle squelettique, le muscle cardiaque) et l'épithélium, et modérément exprimée dans les autres tissus et types cellulaires (270). La Na^+ , K^+ ATPase fonctionne chez presque tous les animaux comme régulateur principal des concentrations intracellulaires des ions Na^+ et des ions K^+ . Durant chaque cycle actif de l'enzyme, trois ions Na^+ sont pompés hors de la cellule en échange de deux ions K^+ entrant, pour chaque molécule d'ATP consommée (389). La Na^+ , K^+ -ATPase maintient une concentration élevée en K^+ (120 -140 mM) par pompage actif de l'environnement extracellulaire où la concentration en K^+ est d'environ 5 mM (270). Cette accumulation intracellulaire en K^+ est essentielle pour l'activité des enzymes. La forte pression osmotique à l'intérieur de la cellule est opposée à la forte concentration en Na^+ à l'extérieur de la cellule (140 mM) alors que la concentration en Na^+ à l'intérieur de la cellule est faible (10-20 mM) (382).

La Na^+ , K^+ -ATPase apparaît essentielle pour de nombreuses fonctions dans l'organisme. Le transport transépithélial dans l'intestin, les reins et les glandes sécrétoires est entièrement dépendant de la Na^+ , K^+ -ATPase basolatérale (225). Dans le muscle cardiaque et les nerfs, la Na^+ , K^+ -ATPase agit comme régulateur indirect de la contraction en déterminant l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (40). L'influx nerveux ou le potentiel d'action musculaire est une dépolarisation du potentiel membranaire due à une augmentation transitoire de la perméabilité au Na^+ , avec un influx de Na^+ suivi par une repolarisation due à un efflux de K^+ de la cellule. Ceci aboutit à une augmentation du Na^+ intracellulaire et une diminution du K^+ . La durée de ce potentiel d'action est déterminée par les courants K^+ , elle est de quelques millisecondes dans les muscles squelettiques et les neurones, en revanche dans le cœur, le potentiel d'action se prolonge sur une durée d'environ 600 ms (368) et doit être subséquentement compensé par la Na^+ , K^+ -ATPase pour rétablir potentiel membranaire de repos (127). Dans les tissus musculaires, la concentration intracellulaire en K^+ est de 160 mM. Environ 75% du K^+ total du corps humain est localisé dans le muscle alors que le muscle cardiaque renferme 1% du K^+ total pour un pourcentage de poids corporel de 40% et 0,4%, respectivement (368). Après la contraction musculaire, la Na^+ , K^+ -ATPase est essentielle pour rétablir le potentiel de repos, éviter la fatigue

musculaire et réduire les niveaux potentiellement toxiques du K^+ présent dans le plasma (288). En plus de son rôle dans la régulation de la $[Na^+]_i$ et de la $[K^+]_i$, la Na^+ , K^+ -ATPase influence le potentiel membranaire (E_m) due à son électrogénicité ($3 Na^+$ et $2 K^+$). En fait, dans des cellules dont la membrane plasmique a une résistance électrique élevée et comporte de nombreuses Na^+ , K^+ -ATPase, l'inhibition de cette enzyme provoque une dépolarisation instantanée jusqu'à 20-30mV, pour plus de détails, reportez-vous à la section 1.4.1. L'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase est également requise pour la formation des jonctions serrées, des desmosomes et l'induction de la polarité des cellules épithéliales (341).

Le gradient électrochimique généré par la Na^+ , K^+ -ATPase, pour le Na^+ vers l'intérieur et le K^+ vers l'extérieur représente une source d'énergie utilisée pour le maintien de l'équilibre osmotique de la cellule. Le transport des autres substances dans et en dehors de la cellule est réalisé par un certain nombre de protéines qui agissent comme co- ou contre-transporteurs. Ces mécanismes de transports secondaires utilisent l'énergie générée par le gradient de Na^+ pour acheminer du glucose (78), des acides aminés (23), des dérivés d'acides aminés (410) et des neurotransmetteurs (348). Dans la cellule, ces transporteurs permettent également la translocation des ions (H^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) à travers la membrane plasmique, permettant ainsi de résoudre les problèmes osmotiques engendrés par la présence dans le cytoplasme de protéines chargées négativement, et auxquelles la membrane cellulaire est imperméable, et la maintenance de l'homéostasie acide-base (39), (420). (figure 1, page 8). La Na^+ , K^+ -ATPase occupe un rôle clé dans le maintien du volume cellulaire basal, alors que les transporteurs et les canaux ioniques sont impliqués soit dans un processus de régulation de l'augmentation du volume (RAV) impliquant l'échangeur Na^+/H^+ et le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$, soit dans un processus de régulation de la diminution du volume (RDV) impliquant le cotransporteur et K^+/Cl^- et les canaux K^+ et Cl^- (226, 276). La Na^+ , K^+ -ATPase influence également l'activité du contre-transporteur Na^+/H^+ , essentiel pour la régulation du pH intracellulaire (pH_i) de la cellule (165) et la motilité des spermatozoïdes (427).

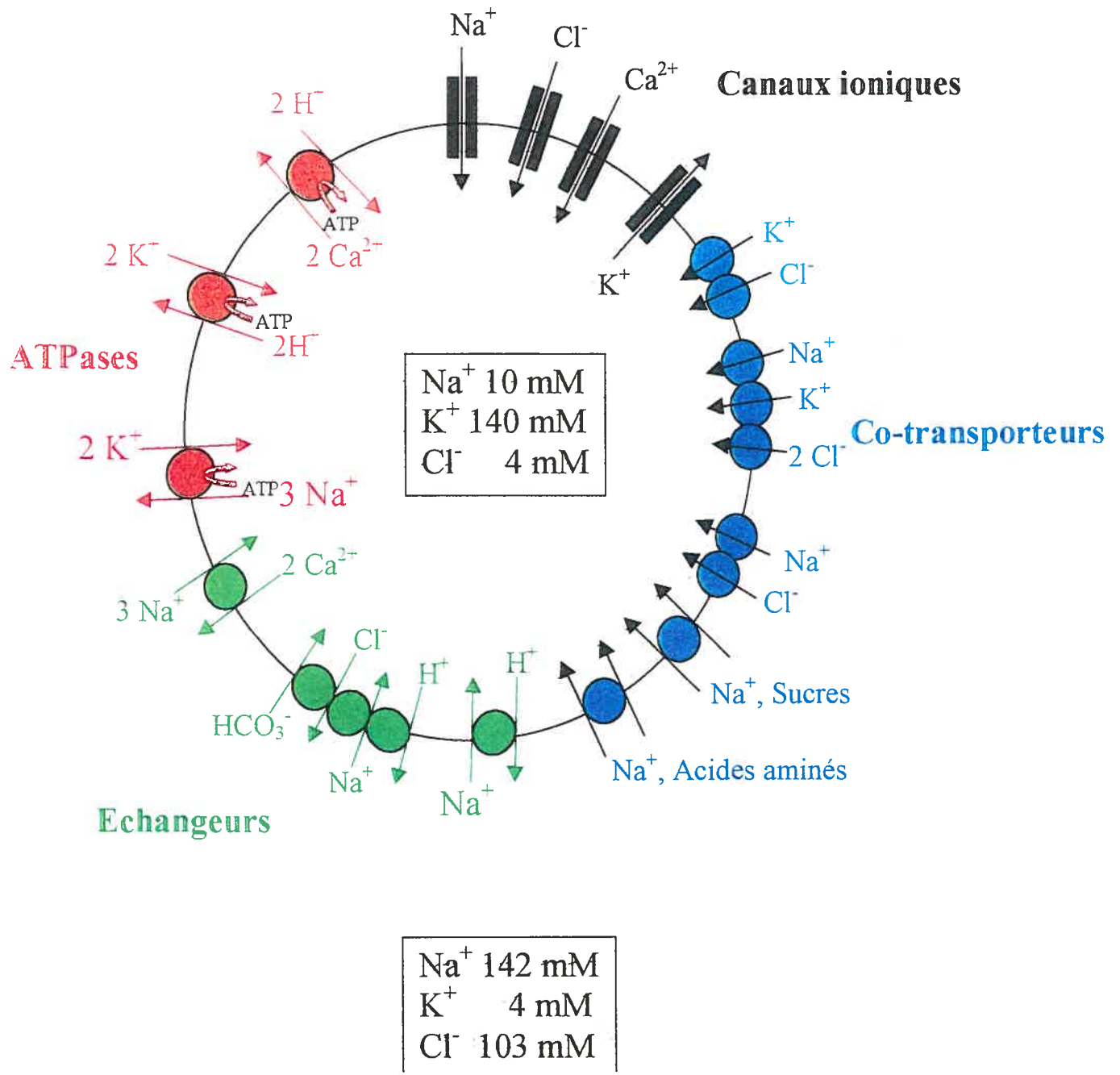


Figure 1 : La Na^+ , K^+ -ATPase et les autres transporteurs ioniques dans une cellule animale animale. (figure adaptée de Mobasheri et al. 2000. 270)

Le gradient transmembranaire du Na^+ et du K^+ généré par la Na^+, K^+ -ATPase ainsi que la perméabilité relative de la membrane plasmique pour le K^+ , le Na^+ et le Cl^- sont les déterminants majeurs du potentiel membranaire. Ainsi, la plus grande perméabilité de la membrane cellulaire aux ions K^+ par rapport aux autres cations détermine le potentiel membranaire, ce qui signifie que le K^+ , ayant un potentiel d'équilibre (E_K) de -87 mV, sort de la cellule plus vite que le Na^+ entre, celui-ci ayant un potentiel d'équilibre (E_{Na}) de $+60$ mV. Ceci aboutit à un potentiel de diffusion à travers la membrane, négatif à l'intérieur, ce qui ralentit le flux de K^+ vers l'extérieur de la cellule et augmente l'influx de Na^+ jusqu'à ce que le potentiel atteigne une valeur d'équilibre entre -70 et -80 mV, valeur à laquelle la vitesse des deux flux sont égaux, à l'état de repos (382). Le potentiel membranaire est la base pour le fonctionnement de tous les tissus excitables.

1.2 Biologie moléculaire de la Na^+, K^+ -ATPase

1.2.1 Structure des sous-unités α et β de la Na^+, K^+ -ATPase

La Na^+, K^+ -ATPase est un complexe enzymatique se composant de deux sous-unités polypeptidiques (α, β) en quantité équimolaire. Une troisième sous-unité, appelée γ est associée aux sous-unités α et β fonctionnelles en quantité équimolaire et se retrouve principalement dans le rein (28). La structure oligomérique exacte de la Na^+, K^+ -ATPase est inconnue, plusieurs études ont proposé que la dimérisation des complexes ($\alpha\beta$) puisse constituer l'unité fonctionnelle de la Na^+, K^+ -ATPase (17), bien qu'une unité monomérique puisse occlure à la fois le Na^+ et le K^+ , apparaissant ainsi comme l'unité minimale requise pour le transport (37) (figure 2, page 10). D'autres études ont suggéré que la formation des dimères ($\alpha\beta$)₂ implique des états conformationnels qui se réalisent transitoirement durant le cycle de transport (75).

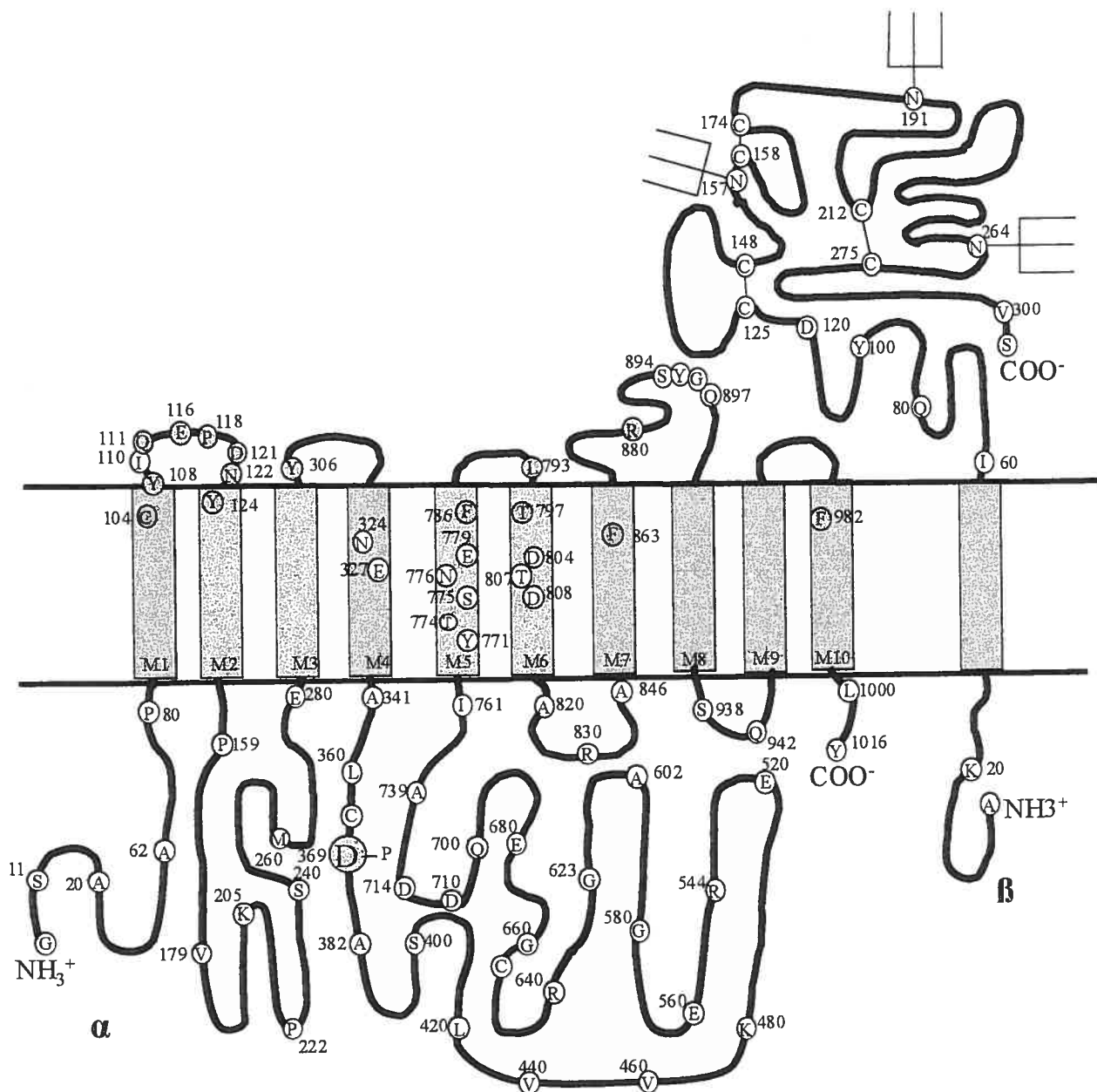


Figure 2 : Représentation de la structure des sous-unités de la Na⁺, K⁺ ATPase rénale de cochon et de leurs modifications post-traductionnelles (α1, β1).

Chaque cercle illustre un acide aminé, symbolisé par le code unilette, et sa position relative dans la séquence. Le cercle obscurci représente la position du site de phosphorylation par l'ATP et les cercles représentés en bleu illustrent les sites de liaison potentiels de la ouabaine. Les régions transmembranaires sont définies par la lettre M et numérotées de 1 à 10

(Figure adaptée de Jørgensen et al. 1998, 194)

1.2.1.1 Structure de la sous-unité α

La sous-unité α se compose approximativement de 1000 acides-aminés et a une masse moléculaire d'environ 110 kDa. Quatre isoformes ont été identifiées ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$), la différence de séquence entre ces isoformes reste mineure. Des analyses par hydropathie ainsi que des études biochimiques utilisant l'enzyme purifiée ont permis d'établir un modèle comportant dix segments transmembranaires (M1 à M10) (199). Cinq boucles extracellulaires ont été identifiées, les extrémités N-terminale et C-terminale sont intracellulaires. L'homologie entre la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique /sarcoplasmique (SERCA) et la Na^+ , K^+ -ATPase (les séquences ayant 30% d'identité et 65% de similarité) a permis une projection de la structure de la Na^+ , K^+ -ATPase sur la structure cristalline à haute résolution de SERCA (2.6 Å) obtenue récemment (390). Cette comparaison confirme que les boucles extracellulaires reliant les domaines transmembranaires sont courtes (entre 6 et 12 résidus) à l'exception de la boucle entre les segments membranaires M7 et M8 (42 résidus) (198), qui semble importante pour l'interaction avec la sous-unité β . De plus, il existe trois structures intracellulaires principales, la boucle centrale entre les segments transmembranaires M4-M5 composée d'environ 430 acides aminés, une longue queue N-terminale d'environ 90 acides aminés et une boucle intracellulaire d'environ 120 résidus entre les segments transmembranaires M2 et M3 (198).

La sous-unité α est également la cible spécifique des glycosides incluant la ouabaïne et la digoxine. Ceux-ci ont un effet sur la surface externe de la pompe où plusieurs acides aminés impliqués dans la sensibilité à la ouabaïne ont été identifiés par mutagenèse dirigée (figure 2, page 10). Ces acides aminés sont localisés dans plusieurs régions de la sous-unité α (236, 194). Toutefois, en considérant la localisation topologique de certains acides aminés il est possible que leur substitution ait un effet indirect sur la liaison à la ouabaïne, en forçant une conformation enzymatique ayant une faible affinité pour ce composé (237). Aucune de ces substitutions ne confère une résistance complète à la ouabaïne. La ouabaïne puisse se lier à la fois aux régions transmembranaires M1-M2 et à des régions comprenant les régions M4, M5 et M6 qui contiennent les sites de liaison au K^+ ; ainsi, cette liaison de

la ouabaïne va prévenir les changements de conformation associés à l'interaction de ces régions avec les cations (236).

1.2.1.2 Structure de la sous-unité β

La sous-unité β , appelée sous-unité régulatrice semble nécessaire à la maturation et à l'activité de la sous unité α de la Na^+ , K^+ -ATPase. La sous-unité β est une protéine membranaire de type II d'environ 300 acides aminés, c'est à dire qu'elle ne comporte qu'un seul segment transmembranaire, une courte extrémité N-terminale cytoplasmique (30 acides aminés) et un grand domaine extracellulaire (ectodomaine, 230 acides aminés) (166). Trois isoformes β (β_1 , β_2 et β_3) associées à la sous-unité α de la Na^+ , K^+ -ATPase ont été répertoriées, une quatrième sous-unité β associée à la H^+ , K^+ -ATPase a également été identifiée (125). Les variations de séquence entre les différentes isoformes et entre une même isoforme mais issue d'espèces différentes sont beaucoup plus prononcées que dans le cas des sous-unités α (274). Ces sous-unités β sont des glycoprotéines qui comportent de deux à huit sites de N-glycosylation potentiels dans l'ectodomaine et ayant une séquence consensus, Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel acide aminé (125). La présence de ces sucres liés donne une masse moléculaire apparente de la sous-unité β entre 40 et 60 kDa. Des études ont démontré que la substitution d'un résidu arginine prévient la glycosylation mais n'a qu'un faible impact sur l'activité catalytique de la Na^+ , K^+ -ATPase (25). A l'inverse, la substitution des sept sites de N-glycosylation de la sous-unité β de la H^+ , K^+ -ATPase conduit à la perte de l'activité enzymatique (210). Cette protéine comporte également trois ponts disulfures (S-S) dans le domaine extracellulaire. Dans la sous-unité β_1 de rat, les ponts disulfures se réalisent au niveau de Cys125-Cys148, Cys158-Cys174 et Cys212-Cys275. Toutes les cystéines, et non leur position relative à l'intérieur de la séquence, sont conservées dans les isoformes β_2 et β_3 (125). Ces trois ponts disulfures et la séquence Tyr-Tyr/Phe-Pro-Tyr-Tyr constituent la signature des protéines appartenant la famille des sous-unités β (125).

1.2.2 Mécanisme du flux ionique ou mécanisme d'Albers-Post

Le transport actif du Na^+ et du K^+ par la Na^+, K^+ -ATPase à travers la membrane cellulaire des cellules de mammifères implique une série de réactions, dont la liaison des ions, leur occlusion et leur libération. Le mécanisme général de la réaction de la Na^+, K^+ -ATPase permettant l'expulsion de trois ions Na^+ et l'absorption de deux ions K^+ pour chaque molécule d'ATP hydrolysée a été pour la première fois décrit par Post et Jolly. Leur modèle était des érythrocytes d'origine humaine, incubés dans un milieu Na^+ , à 2°C jusqu'à 5,5 semaines, puis placés dans un milieu à 37°C dans lequel la concentration en K^+ varie et où l'on mesure le contenu ionique des érythrocytes après différents temps d'incubation (328). Par la suite, les équipes d'Albers et de Post en utilisant des fragments de membrane provenant de rein de cobaye ou de l'organe électrique de l'anguille exposés à du $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP ont prouvé que le Na^+ catalyse la phosphorylation de la Na^+, K^+ -ATPase alors que le K^+ favorise sa déphosphorylation (64, 3). Le site de phosphorylation est le groupement carboxylique β de l'acide aspartique 369 (D369) situé dans la grande boucle cytoplasmique (figure 2, page 10) (329).

La réaction catalysée par l'enzyme requiert quatre substrats (Na^+_{i} , K^+_{ext} , ATP, H_2O) et génère quatre produits (Na^+_{ext} , K^+_{i} , ADP, orthophosphate). Bien que plusieurs étapes du cycle demeurent inconnues, le mécanisme général de la réaction, établi par le schéma de Post-Albers (figure 3, page 14), suggère que l'enzyme existe sous deux conformations différentes, chacune existant sous une forme phosphorylée ou déphosphorylée (192). Ces changements de conformation ont été mis en évidence par l'utilisation d'enzymes de digestion telles que la trypsine et la chymotrypsine qui clivent la sous-unité α différemment selon la conformation adoptée par la Na^+, K^+ -ATPase (192). Les fragments générés sont visualisés sur gel puis séquencés (245). Ces changements de conformation peuvent également être mesurés par l'intermédiaire de sondes fluorescentes telles que la fluorescéine 5'-isothiocyanate, l'éosine, la 5-iodoacetamidofluorescéine (IAF) et le RH421, IAF et RH421 n'interférant pas avec la liaison de l'enzyme à l'ATP (244).

Ces états sont appelés E1, pour la conformation de la Na^+, K^+ -ATPase qui a une affinité élevée pour le Na^+ intracellulaire, et E2, pour la conformation ayant une affinité élevée pour le K^+ extracellulaire. Ces intermédiaires subissent des changements de

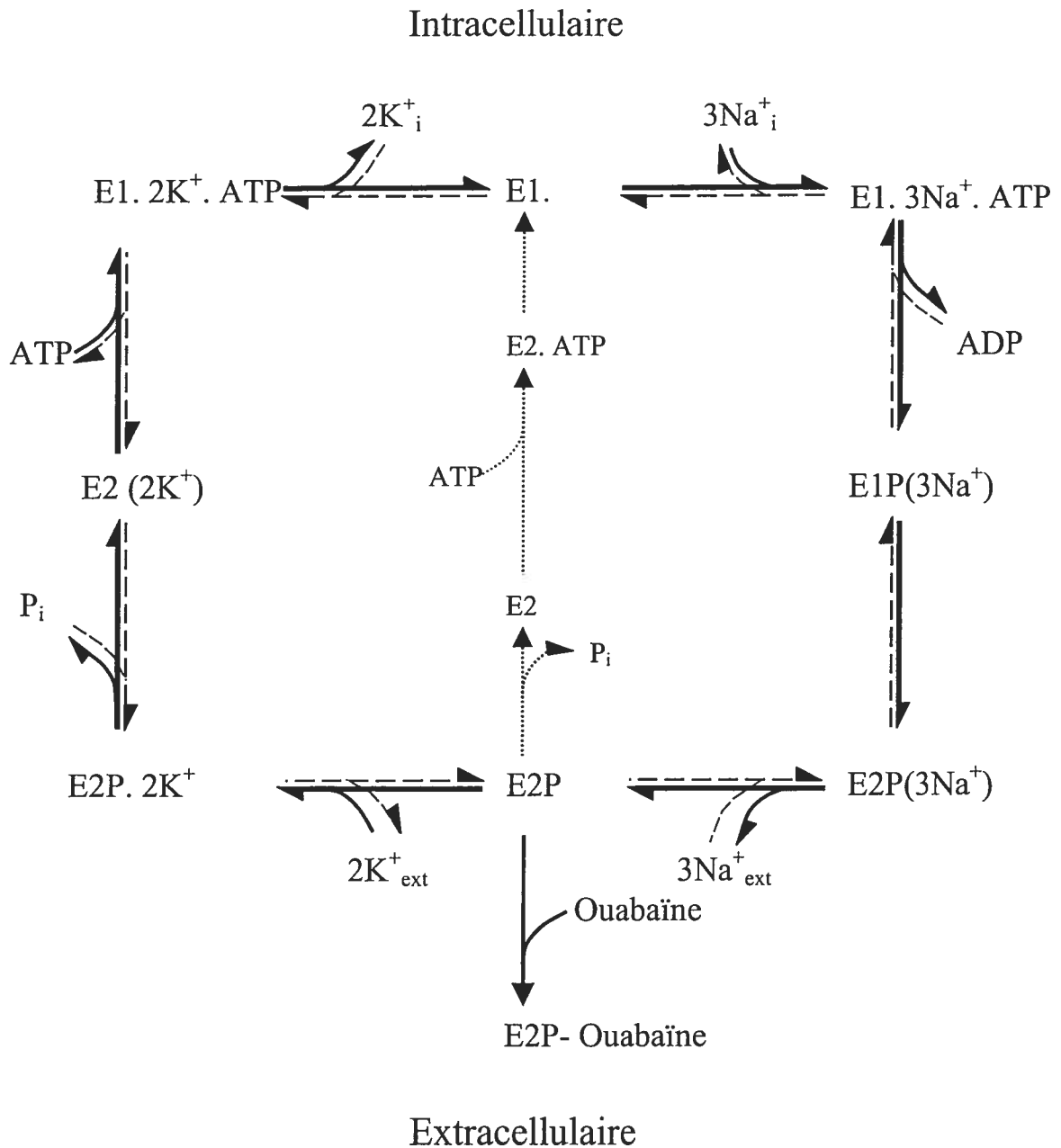


Figure 3 : Schéma de la réaction d'Albers-Post illustrant le cycle de la Na⁺, K⁺-ATPase. Les ions occlus sont représentés entre parenthèses. La voie centrale décrivant l'efflux ionique non couplé dans des milieux dépourvus de K⁺ et de Na⁺.

(Adapté de Glynn, 1993, 129)

conformation (E1P→ E2P et E2→ E1) couplés à des étapes de translocation des ions (128). La liaison à l'ATP et la libération du Pi suivent dans l'ensemble un mécanisme en ping-pong (351).

Dans l'étape initiale du cycle de la réaction, deux ions Na^+ se lient sur deux sites distincts, proches de l'interface cytoplasmique, et sont partiellement occlus, permettant la liaison du troisième ion Na^+ électrogénique (E1-3Na) (359). Un intermédiaire phosphorylé lié au Na^+ est formé par la réaction du Mg-ATP avec l'enzyme. Cet intermédiaire (E1P-3Na) a comme l'ATP une énergie libre d'hydrolyse élevée, et peut dans certaines conditions être déphosphorylé par l'ADP pour reformer de l'ATP (120). L'occlusion et la translocation du Na^+ à travers la membrane sont donc couplées au transfert du phosphate en position γ de l'ATP sur un acyl de l'aspartate en position 369 de la sous-unité α . Cette translocation s'accompagne d'une transition entre un intermédiaire ayant une énergie libre élevée, E1P(3Na), à un intermédiaire de faible énergie libre, E2P(2Na). Dans la conformation E2P, l'affinité pour le Na^+ est faible, celui-ci est libéré sur la face extracellulaire de la membrane. Le K^+ se combine alors avec une affinité élevée au site de liaison extracellulaire et provoque la déphosphorylation de l'enzyme, libérant le phosphate inorganique (129). L'ATP peut également se lier avec une faible affinité apparente ($K_m \approx 0.2 - 0.4 \text{ mM}$) à la conformation $E_2(2K)$ ayant occlue le K^+ , cette liaison de l'ATP accélère la transition $E_2(2K) \rightarrow E1-2K^+$ avec déocclusion du K^+ à la surface cytoplasmique. L'ATP se lie avec une affinité apparente plus élevée à la conformation E1 ($K_D \approx 0.1-0.2 \text{ }\mu\text{M}$). L'augmentation de l'énergie de liaison de l'ATP associée à la transition de la conformation $E_2(2K)$ à une conformation E1-2K constitue la force motrice du transport du K^+ à travers la membrane (193). L'enzyme dans sa forme E1 est à nouveau disponible pour lier le Na^+ . Dans certaines conditions en l'absence de Na^+ ou de K^+ dans le milieu extracellulaire, il est possible de détecter un échange K^+/K^+ ou Na^+/Na^+ , avec un changement de conformation de la Na^+,K^+ -ATPase (130).

Il est également important de remarquer que la liaison de la ouabaine à la Na^+,K^+ -ATPase se produit avec une affinité élevée uniquement lorsque celle-ci adopte la conformation E2P. La ouabaine inhibe spécifiquement la réaction de protéolyse catalysée

par le K^+ et permet la libération de l'orthophosphate (P_i) ainsi que le changement subséquent de conformation E1 (64). L'analyse de la conformation de la Na^+,K^+ -ATPase en présence de ouabaine est réalisée par l'intermédiaire de la chymotrypsine et par la détermination de l'intensité de fluorescence. Elle suggère que la ouabaine stabilise l'enzyme dans une sous-conformation de E2P (191). Dans les autres conformations (E1(Na) ou E2(K)), l'affinité pour la ouabaine est fortement réduite (313), toutefois des travaux suggèrent que l'interconversion entre E1P et E2P est stimulée par la ouabaine (437). D'autres études ont également démontré l'action antagoniste du K^+ dans la liaison de la ouabaine à la sous-unité α de la Na^+,K^+ -ATPase (20). Le K^+ diminue la constante de vitesse d'association de la ouabaine à la Na^+,K^+ -ATPase, sans modifier sa constante de vitesse de dissociation (96). De façon similaire les ions Na^+ agissent de façon antagoniste sur la liaison de la ouabaine, en se liant à la conformation E1 et en réduisant la quantité d'enzyme disponible dans la conformation E2 pour la formation de la phosphoenzyme E2P (279).

1.2.3 Isoformes α et β

1.2.3.1 Isoformes α

La première démonstration directe de l'existence de deux isoformes de la Na^+, K^+ -ATPase est venue de deux études indépendantes du cerveau de différents mammifères (387) et de l'artémia (322). Ces études ont permis de mettre en évidence une mobilité électrophorétique différente et d'identifier un doublet de la sous-unité α . La présence de différentes isoformes dans des organismes primitifs tels que l'hydre ou le dard-perche suggèrent que la divergence des gènes codant pour les sous-unités α se réalise très tôt au cours de l'évolution (206). Dans les cellules de mammifères, trois isoformes α ont par la suite été identifiées par le clonage de l'ADNc et par l'utilisation d'anticorps spécifiques (389), une quatrième sous-unité α (α_4) a également été identifiée au niveau transcriptionnel (370). Ces sous-unités diffèrent par leur localisation chromosomique, leur spécificité tissulaire et cellulaire, leur sensibilité aux glycosides, leur régulation hormonale et leurs propriétés cinétiques. Les gènes codant pour chacune des sous-unités α ont été localisés sur

des chromosomes différents (tableau II, page 17) (433). Ces gènes comportent 23 exons et 22 introns et s'étendent sur environ 26-27 kb (376), à l'exception du gène codant pour la sous-unité $\alpha 4$ qui comportent 22 exons et 21 introns (206). L'homologie entre les séquences codantes des gènes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ est d'environ 70%. Les sous-unités α comportent environ 1000 acides aminés, ainsi chez le rat la longueur de la séquence peptidique des différentes sous-unités α reste sensiblement identique : $\alpha 1$: 1024, $\alpha 2$: 1021, $\alpha 3$: 1014 et $\alpha 4$: 1028 acides aminés. Le degré d'identité entre espèces différentes, pour les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est d'environ 92% alors qu'il est supérieur à 96% pour $\alpha 3$. Le degré d'identité entre les isoformes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ est d'environ 85% (389) alors que $\alpha 4$ partage 82% d'identité avec $\alpha 2$ et 79.8% avec $\alpha 1$ (206). La plus grande variabilité entre les isoformes se situe à l'extrémité N-terminale, au niveau des sites de liaison à la ouabaïne entre les segments transmembranaires 1 et 2 et entre les acides aminés 403 et 503 (39). L'isoforme $\alpha 1$ est retrouvée dans la plupart des tissus et semble être la forme prédominante ou exclusive dans le rein et la plupart des épithélia (439). L'isoforme $\alpha 2$ semble prédominante dans les muscles squelettiques (309) et abondante dans le coeur le tissu

Tableau II : localisation des gènes codant pour les sous-unités α et β de la Na^+ , K^+ -ATPase

Sous-unité	Identification	Localisation chromosomique		
		Humain	Souris	Rat
$\alpha 1$	ATP1A1	1p13	3	2q34
$\alpha 2$	ATP1A2	1q21-q23	1	13 q24-q26
$\alpha 3$	ATP1A3	19q13.31	7	1q21
$\alpha 4$	ATP1A4 (ATP1AL2)	1q21-q23	1	13q23
$\beta 1$	ATP1B1	1q22-q25	1	13q22
$\beta 2$	ATP1B2	17p13.1	11	10q24
$\beta 3$	ATP1B3	3q22-q23	9	8q31

adipeux et les cellules gliales du cerveau (320). L'isoforme $\alpha 3$ est prédominante dans les neurones et le système nerveux central (320), en plus faible quantité dans les ovaires (317) et le cartilage (271). La spécificité tissulaire est fortement démontrée par l'isoforme $\alpha 4$, qui est spécifiquement localisée dans les testicules en particulier dans les spermatozoa (427). Des données récentes obtenues à partir de tissu cardiaque ont démontré la présence de plusieurs isoformes ($\alpha 1$ et $\alpha 2$), localisées dans différentes régions d'une même cellule (187).

La sous-unité α subit des modifications traductionnelles et post-traductionnelles, les 5 premiers acides aminés sont clivés lors de la maturation des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Plusieurs autres mécanismes sont impliqués dans la génération d'isoforme α , des variations du processus de maturation transcriptionnel de l'ARNm de la sous-unité $\alpha 1$ se produisent dans certaines cellules, aboutissant à une sous-unité $\alpha 1$ tronquée appelée $\alpha 1$ -T. Cette sous-unité $\alpha 1$ -T a été retrouvée dans le muscle lisse vasculaire (264). Ce polypeptide a une masse moléculaire de 66kDa, comporte les 554 premiers acides-aminoés de la sous-unité $\alpha 1$ et se termine par un peptide de 27 acides aminés provenant de la traduction d'une région intronique non épissée. Cette protéine conserve le site de liaison à l'ATP et le site de phosphorylation pouvant fonctionner comme ATPase (264). Des travaux récents indiquent que la protéine $\alpha 1$ -T peut se localiser au niveau de la membrane et se combiner à la sous-unité $\beta 2$ dans des systèmes hétérologues d'expression utilisant les cellules d'insecte Sf-9. La protéine $\alpha 1$ -T peut également être phosphorylée par l'ATP de manière Na^+ -dépendante et déphosphorylée de manière K^+ -dépendante (4), ces données suggérant une activité Na^+ , K^+ -ATPase classique. La protéine $\alpha 1$ -T de rat est également résistante à la ouabaïne (4). D'autres isoformes $\alpha 1$ et $\beta 1$ tronquées ont été mises en évidence dans l'épithélium rétinale humain (350).

1.2.3.2 Isoformes β

Trois isoformes β , associées à la sous-unité α de la Na^+ , K^+ -ATPase, ont été identifiées au niveau génétique et protéomique chez les mammifères. Les gènes codant pour chacune des sous-unités β sont localisés sur des chromosomes différents (tableau II,

page 17). Toutefois, plusieurs études ont suggéré l'existence d'isoformes β additionnelles. Des études moléculaires réalisées sur la Na^+ , K^+ -ATPase de poisson suggèrent jusqu'à sept formes distinctes de sous-unité β (80).

Chez le rat, la sous-unité $\beta 1$ comporte 304 acides aminés, $\beta 2$ en possède 290 et $\beta 3$ 279 acides aminés. L'homologie entre les isoformes $\beta 1$ et entre les isoformes $\beta 2$ est de 95% chez les mammifères mais chute à 60% en incluant d'autres classes. L'homologie entre les isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ est de 58% (34% de similarité et 24% de d'identité), alors que $\beta 3$ et $\beta 1$ sont homologues à 68% avec une identité de 39%. Les isoformes $\beta 2$ et $\beta 3$ sont similaires à 61% et identiques à 49% (251). Toutes les isoformes β sont glycosylées, l'isoforme $\beta 1$ de mammifère comporte 3 sites de N-glycosylation, le nombre de sites pour l'isoforme $\beta 2$ varie selon les espèces : celle de poulet comporte quatre sites potentiels, celle de rat en a sept, et celle d'humain en compte huit alors que la souris en dispose de neuf ; on ignore si tous ces sites sont utilisés (70). L'isoforme $\beta 3$ ne comporte que deux sites potentiels de glycosylation chez le rat (15). L'expression de l'isoforme $\beta 1$ est détectée dans tous les tissus et de façon prédominante dans le rein (259). L'isoforme $\beta 2$ est exprimée de façon prédominante dans le cerveau (378), la glande pinéale (377), les cellules photoréceptrices de la rétine (361) et la rate (259). A l'origine, la sous-unité $\beta 2$ de la Na^+ , K^+ -ATPase a été identifiée comme une molécule d'adhésion sur les glia (AMOG), permettant une adhésion entre les neurones et les astrocytes (9). L'isoforme $\beta 3$ est le membre de la famille des gènes β décrit le plus récemment, elle est exprimée de façon prédominante dans les testicules mais elle est également retrouvée dans le cerveau, le rein, les poumons, la rate, le foie et le petit intestin et le colon (251). Chacune des isoformes β est susceptible de s'associer avec chaque isoforme α , contribuant à l'hétérogénéité de la Na^+ , K^+ -ATPase (77).

1.2.3.3 Propriétés enzymatiques et signification physiologique des isoformes

L'étude des propriétés enzymatiques des isoformes de la Na^+ , K^+ -ATPase a été compliquée par la présence de nombreuses isoformes dans les cellules. L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis l'utilisation de systèmes d'expressions hétérologues. En utilisant les différences de sensibilité à la ouabaïne entre les rongeurs et

les autres mammifères, l'étude des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de rat a pu être réalisée (188). D'autre part, la mutation de deux résidus dans la boucle extracellulaire entre les segments transmembranaires 1 et 2, L111R et N122D pour $\alpha 2$ et Q108R et N119D pour $\alpha 3$ a permis de conférer à ces sous-unités une résistance à la ouabaine et de séparer leurs caractéristiques enzymologiques des formes endogènes sensibles à la ouabaine (188). Les complexes $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ ont une affinité apparente sensiblement identique pour le Na^+ , le K^+ et l'ATP, alors que le complexe $\alpha 3\beta 1$ a une affinité apparente plus faible pour le Na^+ mais plus élevée pour le K^+ et l'ATP (188, 281) (tableau III, page 21). Les différences observées entre les valeurs obtenues par l'équipe de Lingrel et celle de Blostein reposent sur le fait que dans le premier laboratoire cité, les études ont été réalisées sur des fragments membranaires de cellules HeLa alors que le second a conduit ses travaux sur des cellules HeLa intactes. En considérant ceci, il peut être suggéré que l'affinité de la Na^+ , K^+ -ATPase pour le Na^+ est affectée par l'altération des propriétés de la membrane plasmique lors de sa rupture, et notamment l'altération du cytosquelette (voir section 1.3.3.4) ou encore par les problèmes survenant lors de la modulation de la $[\text{Na}^+]_i$ dans des cellules intactes traitées à la monensine, un ionophore du Na^+ .

D'autres études ont utilisé un système d'expression impliquant un baculovirus porteur de l'ADNc de chacune des isozymes pour infecter des cellules d'insecte Sf-9, ces cellules contenant une faible quantité de Na^+ , K^+ -ATPase endogène (tableau III, page 21). Ces études ont permis d'établir que l'affinité pour le Na^+ varie selon la séquence d'isozymes suivante : $\alpha 2\beta 2 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 4\beta 3 = \alpha 4\beta 1 > \alpha 1\beta 1 = \alpha 3\beta 2 > \alpha 3\beta 1$. L'affinité pour le K^+ diffère selon la séquence suivante $\alpha 1\beta 1 > \alpha 2\beta 1 = \alpha 2\beta 2 > \alpha 4\beta 3 = \alpha 4\beta 1 = \alpha 3\beta 1 = \alpha 3\beta 2$ (tableau III, page 21). Les valeurs du K_m pour l'ATP sont équivalentes pour les isoformes $\alpha 2$ et $\alpha 3$, approximativement deux fois plus faibles que celles de l'isoforme $\alpha 4$ et près de quatre fois plus faibles que celle de $\alpha 1\beta 1$ (tableau III, page 21) (39, 38).

La différence entre ces résultats et ceux obtenus par Jewell et Lingrel peut impliquer l'utilisation des oocytes de *Xenopus laevis*. En revanche, l'affinité pour le K^+ semble forte pour les complexes $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 3$ et $\alpha 1\beta 2$, intermédiaire pour les complexes $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 2\beta 3$ et $\alpha 3\beta 2$ et plus faible dans le cas du complexe $\alpha 2\beta 2$ (tableau III, page 21) (77). Ces

Tableau III : Caractéristiques cinétiques de la Na⁺, K⁺-ATPase de rat et d'humain.

Organisme	Isozyme	Na ⁺ K _{0,5} (mM)	K ⁺ K _{0,5} (mM)	ATP Km (mM)	Ouabaine Ki (M)	Paramètre mesuré	Références	
Rat (a)	α1	8,96 ± 1,28	0,22 ± 0,02			Influx du ⁸⁶ Rb ⁺	331	
		1,15 ± 0,13	0,45 ± 0,01			Libération du ³² Pi	213	
		12,48 ± 1,6	0,22 ± 0,02			Influx du ⁸⁶ Rb ⁺	331	
	α2	1,05 ± 0,11	0,43 ± 0,004			Libération du ³² Pi	213	
		78,72 ± 17,6	0,09 ± 0,01			Influx du ⁸⁶ Rb ⁺	331	
		3,08 ± 0,06	0,27 ± 0,01			Libération du ³² Pi	213	
	Rat (b)	α1β1	16,4 ± 0,7	1,9 ± 0,2	0,46 ± 0,10	4,3 ± 1,9 x 10 ⁻⁵		42
		α2β1	12,4 ± 0,5	3,6 ± 0,3	0,11 ± 0,01	1,7 ± 0,1 x 10 ⁻⁷		42
		α2β2	8,8 ± 1,0	4,8 ± 0,4	0,11 ± 0,02	1,5 ± 0,2 x 10 ⁻⁷	Libération du ³² Pi	42
α3β1		27,9 ± 1,3	5,3 ± 0,3	0,09 ± 0,01	3,1 ± 0,3 x 10 ⁻⁸		45	
α3β2		17,1 ± 1,0	6,2 ± 0,4	0,07 ± 0,03	4,7 ± 0,4 x 10 ⁻⁸		45	
α4β1		13,5 ± 1,3	5,9 ± 1,1	0,19 ± 0,04	6,4 ± 0,4 x 10 ⁻⁸		43	
α4β3		12,9 ± 0,6	5,0 ± 0,3	0,18 ± 0,04	1,8 ± 0,7 x 10 ⁻⁸		43	
α1β1		8,3 ± 0,6	0,92 ± 0,11		1,95 ± 0,05 x 10 ⁻⁸		90	
α2β1		12,8 ± 2,2	1,30 ± 0,17		3,69 ± 0,21 x 10 ⁻⁸	Courant induit par le K ⁺	90	
Humain (c)	α2β2		2,70 ± 0,30		2,65 ± 0,65 x 10 ⁻⁸	Potentiel inverse du	90	
	α3β1	24,7 ± 2,4	0,90 ± 0,27		1,43 ± 0,08 x 10 ⁻⁸	courant sensible à	90	
	α3β2		1,60 ± 0,10		1,76 ± 0,2 x 10 ⁻⁸	l'amiloride du canal Na ⁺	90	

L'affinité apparente ($K_{0,5}$) pour le Na^+ , le K^+ , la ouabaine et valeurs de K_m pour l'ATP sont mesurées soit par la libération du ^{32}Pi à partir du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, soit en mesurant l'influx de $^{86}\text{Rb}^+$, et en présence de monensine pour la détermination de l'affinité pour le Na^+ .

(a) Les sous unités de la Na^+ , K^+ - ATPase de rat sont exprimées dans les HeLa et la distinction vis à vis des sous-unités endogènes est réalisée par l'intermédiaire de leur résistance à la ouabaine. La sous-unité $\alpha 1$ est naturellement résistante à la ouabaine alors que les sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ sont rendues résistantes par mutagenèse dirigée de deux acides aminés L111R et N122D pour $\alpha 2$ et Q108R et N119D pour $\alpha 3$.

(b) Les différentes isozymes sont exprimées dans des cellules d'insectes Sf-9 qui sont pratiquement dépourvues de Na^+ , K^+ - ATPase endogène.

(c) L'ARN des différentes sous-unités de la Na^+ , K^+ - ATPase d'origine humaine est injecté dans des oocytes de *Xenopus*. L'affinité apparente pour le K^+ est mesurée par l'activation du courant de la Na^+ , K^+ - ATPase. L'affinité apparente pour le K^+ est mesurée par l'activation du courant de la Na^+ , K^+ - ATPase. L'affinité apparente pour le Na^+ est mesurée par l'intermédiaire de la conductance induite sensible à l'amiloride des canaux Na^+ sensibles à l'amiloride, dont l'ARN des différentes sous-unités sont co-injectés avec ceux de la Na^+ , K^+ - ATPase.

Références : Munzer et al, 1994 (331), Jewell et Lingrel, 1991 (213), Blanco et al, 1995 (42), Blanco et al, 1995 (45), Blanco et al, 1999 (43), Crambert et al, 2000 (90).

variations semblent dues soit à des conditions expérimentales différentes, soit à un mécanisme de coopération entre les isoformes α et β qui détermine l'affinité apparente pour le K^+ et qui peut différer selon les isoenzymes issues d'espèces différentes (93, 402, 77). Des études récentes suggèrent également que les caractéristiques propres à chaque sous-unité impliquent des propriétés mécanistiques distinctes ; comme l'isoforme $\alpha 2$ qui influence l'équilibre de conformation de l'enzyme en faveur de E1. Par ailleurs, les propriétés distinctes de l'isoforme $\alpha 3$ semblent impliquer l'existence d'une liaison aux cations par l'intermédiaire de ligands uniques à l'isoforme $\alpha 3$ (367).

En plus de son rôle de chaperonne de la sous-unité α (125), la sous-unité β influence quelques unes des propriétés de transport intrinsèques de la Na^+ , K^+ -ATPase. Des isoenzymes Na^+ , K^+ -ATPase ou H^+ , K^+ -ATPases exprimées dans des cellules et composées de la même isoforme α mais d'isoformes β différentes confirment que la sous-unité β influence en fait l'affinité apparente pour le K^+ (185). Le transport du K^+ impliquant des changements de conformation des sous-unités α et β (70). La structure de la sous-unité β influence également l'affinité apparente pour le Na^+ (154) et élimine ou réduit le rôle du Na^+ dans la formation de la phosphoenzyme à partir de l'ATP (92). Cette différence dans l'affinité apparente pour le Na^+ des isozymes contenant $\beta 1$ ou $\beta 2$ semble impliquer des différences dans la structure plutôt que dans la composition des sucres liés (20). La sous-unité $\beta 3$ influence légèrement l'affinité de l'enzyme pour le Na^+ , le K^+ et la ouabaïne (440). La signification physiologique de l'influence des sous-unités β sur l'activité des sous-unités catalytiques α reste difficile à déterminer, les propriétés cinétiques sont largement dictées par les isoformes α .

A l'exception de quelques changements subtiles de la réactivité de l'enzyme vis à vis du Na^+ , du K^+ ou de l'ATP, la plus grande différence entre les isozymes réside dans leur sensibilité vis à vis de la ouabaïne. Toutes les isozymes d'origine humaine ont une affinité élevée pour la ouabaïne, de l'ordre du nanomolaire (77), à l'inverse les isozymes de rat ont une différence de sensibilité à la ouabaïne de 10000 fois. Les complexes $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 3$ ont une forte réactivité à la ouabaïne, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 2\beta 2$ ont une réactivité intermédiaire alors que $\alpha 1\beta 1$ a une faible sensibilité à la ouabaïne (tableau III, page 21) (39, 38).

L'expression de ces isoformes avec différentes affinités apparentes pour le Na^+ peut être physiologiquement importante dans le contrôle des concentrations intracellulaires en

Na^+ . La dispersion chromosomique des gènes des isoformes α suggère que leur expression peut être soit activée ou réprimée en fonction de conditions physiologiques spécifiques. Les complexes humains formés par l'isoforme $\alpha 1$ sont sensibles à la fois au Na^+ et au K^+ , ont la plus grande vitesse de renouvellement, l'isoforme $\alpha 3$ ayant la plus faible, et ont une dépendance intermédiaire vis à vis du potentiel membranaire, confirmant ainsi leur rôle d'isoforme ubiquitaire (77). Les isozymes composées de $\alpha 2$ et $\alpha 3$ ont des propriétés de transport qui confirment leur rôle auxiliaire mais indispensable pour restaurer les conditions de repos dans les muscles ou les nerfs après une série de potentiels d'action. Par exemple dans le tissu neuronal, la faible affinité de l'isoforme $\alpha 3$ pour le Na^+ cytosolique suggère que $\alpha 3$ est seulement activée en présence d'une forte concentration en Na^+ pour restaurer le potentiel membranaire (281). Si l'on considère la faible affinité pour le K^+ du complexe $\alpha 2\beta 2$, son expression dans les muscles squelettiques en fait un acteur crucial pour la restauration de l'homéostasie du K^+ externe après une activité physique (77). La localisation subcellulaire des isoformes de la Na^+ , K^+ -ATPase est également importante et peut conférer des propriétés physiologiques uniques et spécifiques à chaque type cellulaire. Les isoformes $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et l'échangeur Na^+/Ca^+ contrôlent apparemment les concentrations subplasmalemmal du $[\text{Na}^+]_{\text{cyt}}$ et $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans des microdomaines restreints entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique/sarcoplasmique (RE/S). En fait, cette région structurellement distincte comportant une portion de la membrane plasmique, RE/S et du cytosol subplasmalemmal agit comme une unité fonctionnelle appelée plasmerosome (195). Les différences entre ces différentes isozymes dans la sensibilité à la ouabaïne doivent être également importantes dans l'adaptation cellulaire à des environnements ioniques et osmotiques variables. Toutefois, ces différences fonctionnelles spécifiques à chacune des isozymes peuvent être masquées par des spécificités tissulaires, qui sont susceptibles d'influencer l'affinité apparente pour le Na^+ , le K^+ et la ouabaïne (388, 188, 98). Il est nécessaire de distinguer les différences spécifiques des tissus de celles spécifiques aux isoformes. Un certain nombre de facteurs sont susceptibles d'influencer l'activité de l'enzyme : l'environnement lipidique, l'interaction avec d'autres protéines telle que la sous-unité γ dans le rein, ou encore des modifications co- ou post- traductionnelles de chacune des sous-unités (402).

L'expression de ces différentes isoformes dans différentes cellules ou différents tissus doit jouer un rôle important au cours du développement de l'organisme. Dans certains organes, des études ont démontré des changements à la fois de la nature spatiale et temporelle de ces isoformes, et également de leur rapport quantitatif les unes par rapport aux autres (159). Ces transitions semblent nécessaires pour l'acquisition des spécificités cellulaires rencontrées au stade adulte (309, 179). Une partie de ces changements est sous le contrôle des hormones thyroïdiennes ou des glucocorticoïdes (243, 310).

1.2.4 Particularité de la sous-unité $\alpha 1$ de rongeur

L'existence d'isoformes α a été mise en évidence par les différences de sensibilité de différents tissus aux glycosides cardiaques tels que la ouabaine (380). Ces études ont également permis de révéler l'hétérogénéité des isoformes α de rongeur par leur affinité pour la ouabaine. L'isoforme $\alpha 1$ de rat a une faible affinité la ouabaine ($CI_{50} > 10000$ nM), alors que les isoformes $\alpha 2$ et $\alpha 3$ ont une affinité plus élevée (CI_{50} est de 10 et 500 nM pour $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (196)). Chez d'autres espèces telles que les primates, le mouton ou le chien, la sensibilité de l'isoforme $\alpha 1$ est de l'ordre du nanomolaire (389). Cette différence de sensibilité est directement imputable à la structure primaire des polypeptides $\alpha 1$ (204). Des analyses structurales, comparant la sous-unité $\alpha 1$ de mouton sensible à la ouabaine à celle issue du rat et résistante à la ouabaine, ont permis de définir une région de résistance dans la première boucle extracellulaire de la protéine (94), deux acides aminés, Gln111 et Asn122, semblent conférer la sensibilité de la sous unité $\alpha 1$ de mouton à la ouabaine, ces résidus sont substitués par deux résidus chargés, Arg111 et Asp122, chez le rat (336). La substitution de ces deux résidus présents dans la sous-unité $\alpha 1$ de mouton par ceux naturellement rencontrés chez le rat produit une sous-unité $\alpha 1$ de mouton ayant une résistance à la ouabaine similaire à celle du rat (336).

1.3 Régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase

1.3.1 Régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase par le Na^+ intracellulaire et l'ATP

L'affinité de la Na^+ , K^+ -ATPase pour le K^+ extracellulaire est supérieure à 0,9 mM (tableau III, page 21) et la concentration en K^+ plasmatique varie entre 4 et 6 mM, ce mécanisme de la régulation de l'activité enzymatique dans des conditions normales doit être probablement exclu. La Na^+ , K^+ -ATPase est activée par le Na^+ et l'ATP au niveau des sites cytoplasmiques et par le K^+ au niveau des sites extracellulaires. Des concentrations en Na^+ situées entre 10-40 mM permettent 50% de l'activation maximale de l'enzyme (tableau III, page 21) qui, selon le tissu, se situe au niveau ou au-dessus de la concentration en Na^+ à l'équilibre (399). Des changements de la concentration en Na^+ cytoplasmique ou la modulation par certaines hormones de l'affinité apparente pour le Na^+ influencent directement l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (399, 117).

Dans chacune des conformations de la Na^+ , K^+ -ATPase, E1 et E2-P, dans laquelle les sites de liaison ionique sont accessibles à partir des phases aqueuses, une compétition entre les cations est observée. Dans les conditions physiologiques normales, la concentration extracellulaire en Na^+ est 20 à 30 fois supérieure à celle du K^+ , toutefois l'enzyme a une affinité d'environ 1000 fois supérieure pour le K^+ sur la face extracellulaire (161). Au niveau des sites cytoplasmiques, le K^+ se comporte comme un inhibiteur compétitif du Na^+ de manière tissu spécifique (402). Dans certains tissus comme le coeur, la conformation E1 de la Na^+ , K^+ -ATPase a une affinité élevée pour le K^+ cytoplasmique, d'autres tissus comme le rein elle a une affinité intermédiaire et d'autres encore comme le petit intestin, elle a une faible affinité pour le K^+ (398). D'autres données indiquent que cet antagonisme Na^+/K^+ réversible peut être régulé par certains composés qui demeurent encore inconnus. Cette régulation est particulièrement importante dans les tissus ayant une fonction spécialisée comme le coeur où cet antagonisme peut influencer les niveaux intracellulaires en Ca^{2+} ; dans d'autres tissus comme le rein et le petit intestin, il permet un contrôle de l'absorption ou de la réabsorption du Na^+ et d'autres composés à travers la membrane apicale (399).

Une activité maximale de 50% est obtenue pour des concentrations en ATP entre 300 et 800 μM , la concentration d'ATP dans la plupart des cellules est saturante pour l'enzyme. Toutefois certaines cellules, comme celles de la médulla du rein, fonctionnent presque dans des conditions d'anoxie pouvant provoquer une diminution de la quantité d'ATP et ainsi limiter l'activité de l'enzyme (383). Un autre aspect important de la régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par l'ATP est la présence d'une sous-unité additionnelle associée aux sous-unités α - β de manière tissu-spécifique et en quantité équimolaire. Des études réalisées à partir d'oocytes de *Xenopus* dans lesquels les différentes sous-unités de la Na^+ , K^+ -ATPase ont été injectés ont permis de révéler que la sous-unité γ affecte plusieurs propriétés de transport de la Na^+ , K^+ -ATPase (29). Des études utilisant des cellules de mammifère indiquent une augmentation de l'affinité pour l'ATP d'environ 2 fois, ce qui s'explique par une stabilisation de la conformation E1 (401). L'effet de la sous-unité γ sur l'affinité pour l'ATP apparaît important pour le fonctionnement de la Na^+ , K^+ -ATPase dans les parties de la médulla du rein en condition d'anoxie, permettant de maintenir l'activité de la pompe en dépit d'une diminution de la production d'ATP (403). D'autres travaux ont démontré que la protéine γ augmente l'antagonisme K^+/Na^+ , cet effet se manifeste par une affinité apparente plus faible pour le Na^+ et n'affecte pas l'équilibre de conformation E1/E2. Cette diminution de l'affinité apparente pour le Na^+ est également importante pour s'adapter à une faible quantité d'ATP et au maintien d'une faible concentration intracellulaire en Na^+ (403). Ces deux effets de la sous-unité γ seraient un mécanisme d'autorégulation pour équilibrer l'utilisation de l'énergie et le maintien des gradients en Na^+ et K^+ à travers les cellules épithéliales rénales (338). D'autres protéines appartenant à la même famille que la sous-unité γ affectent l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase. La protéine FIHC, présente dans le rein et le colon et dont la similarité au niveau de la séquence avec la sous unité γ est supérieure à 50%, affecte différemment le comportement cinétique de la Na^+ , K^+ -ATPase en augmentant l'affinité apparente pour le Na^+ , ayant ainsi une action inverse de celle de la sous-unité γ (27).

1.3.2 Régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase par l'intermédiaire de récepteurs

En considérant les données présentées précédemment, nous avons limité cette section à la régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par des hormones et des neurotransmetteurs par l'intermédiaire de voies indépendantes du Na^+_i et de l' ATP_i . Les données sur la contribution relative des voies de signalisation dépendantes du Na^+_i dans la régulation hormonale sont considérées dans plusieurs revues récentes (117, 105, 319).

L'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase est influencée par une variété d'hormones qui interviennent à court terme et à long terme. Les effets à court terme impliquent une action directe sur le comportement cinétique par la phosphorylation de l'enzyme ou l'activation de récepteurs spécifiques associés à la membrane et qui influencent sa vitesse de renouvellement et son affinité pour les substrats. Les effets à court terme peuvent également être des effets indirects par la mobilisation des enzymes à partir des lieux de stockage intracellulaire. La régulation à long terme affecte la synthèse *de novo* de la Na^+ , K^+ -ATPase ou sa dégradation.

Les hormones stéroïdiennes, en particulier les corticostéroïdes comme l'aldostérone, ont des effets spécifiques à court terme et à long terme. Les corticostéroïdes sont synthétisés et libérés par le cortex des surrénales. L'aldostérone a un rôle important dans le transport du Na^+ et du K^+ dans les tissus épithéliaux tels que le rein, le colon distal (334) ainsi que d'autres tissus comme les cardiocytes de rat (174), les cellules de muscle lisse (292) et l'hippocampe du rat (99). Les effets à court terme se manifestent par une activation rapide de la Na^+ , K^+ -ATPase (369) et provoquent une élévation de la $[\text{Na}^+]_i$ par l'augmentation de la perméabilité membranaire au Na^+ , impliquant soit une translocation de Na^+ , K^+ -ATPase au niveau de la membrane plasmique (45), soit une augmentation de l'affinité intrinsèque de l'enzyme pour le Na^+ (34). Les effets à long terme requièrent une interaction entre le complexe récepteur/aldostérone et le promoteur des sous-unités α et β (414).

L'hormone thyroïdienne est le déterminant majeur de l'activité à l'équilibre de la Na^+ , K^+ -ATPase dans le coeur, le muscle squelettique, le foie et le rein (183). Cette hormone provoque l'augmentation du nombre de Na^+ , K^+ -ATPases à la surface de la cellule en stimulant la vitesse de synthèse des sous-unités α et β (183).

Les catécholamines affectent également l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase, parmi ceux-ci la dopamine et la norépinéphrine ont été les plus étudiées. La dopamine réduit la réabsorption tubulaire du Na^+ , via en partie à l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase. Les effets à court terme de la dopamine impliquent les voies dépendantes de la protéine kinase C (PKC) alors que la régulation à long terme implique les voies dépendantes de la protéine kinase A (PKA) (324). Les effets de la dopamine se réalisent par l'endocytose de la Na^+ , K^+ -ATPase après sa phosphorylation par la PKC au niveau de la Ser-23 (67, 319). Dans certaines parties du néphron, cette inhibition implique une phosphoprotéine de 32 kDa régulée par l'AMPc et la dopamine appelée DARPP-32. Cette protéine est un inhibiteur de protéine phosphatase-1 participant à la régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (357). D'autres catécholamines stimulent la Na^+ , K^+ -ATPase et semblent agir de manière tissu-spécifique. La vasopressine, la norépinéphrine et l'angiotensine stimulent l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase dans le foie (69). L'épinéphrine est impliquée dans l'absorption du K^+ par le muscle squelettique après l'exercice (71) alors que la norépinéphrine agit comme antagoniste de la dopamine dans le néphron (12). Certaines catécholamines agissent également comme neurotransmetteurs dans le cerveau en stimulant la Na^+ , K^+ -ATPase pour le rétablissement des gradients de concentration après l'influx nerveux (158). La stimulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par certaines catécholamines impliquent la voie PKA et la voie PKC (126, 246), ainsi que les récepteurs α -adrénergique ou β -adrénergique (13). L'angiotensine II stimule l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase dans les cellules de muscle vasculaire (301), ainsi que l'expression des ARNm des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ (175). Cette activation semble impliquer différentes voies de signalisation dépendamment du type cellulaire considéré, dans les astrocytes et thyrocytes celle-ci se réalise par l'intermédiaire du récepteur AT-1 et de la PKC- δ pour les astrocytes (283) et de la PKC- ζ pour les thyrocytes (258), d'autres voies d'activation indépendantes des PKC sont également impliquées mais demeurent inconnues (301). Un effet inhibiteur de l'angiotensine II sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase a également été rapporté dans les cellules de la zona glomerulosa des surrénales et impliquerait l'activation de tyrosine phosphatases (436).

Les hormones peptidiques représentent une classe majeure de régulateurs de la Na^+ , K^+ -ATPase. Parmi ceux-ci, l'insuline est la principale hormone anabolique qui occupe un rôle central dans l'homéostasie du K^+ . L'augmentation de la réabsorption du K^+ dans

plusieurs tissus a été attribuée à l'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase par l'insuline (391). Plusieurs effets à court terme de l'insuline ont été répertoriés, la translocation des sous-unités de la Na^+ , K^+ -ATPase sur la membrane cellulaire à partir de lieux de stockage intracellulaire est le mécanisme principal de régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase dans le muscle squelettique (294). Cette redistribution peut être spécifique à l'isoforme α (257). L'insuline active également la Na^+ , K^+ -ATPase par l'augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ en activant le cotransporteur Na^+ , K^+ , 2Cl^- (355) l'échangeur Na^+/H^+ (212) et les canaux Na^+ (263). Dans le rein, l'effet antinatriurétique de l'insuline semble impliquer une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le Na^+ (103). Cet effet à court terme de l'insuline semble également impliquer la phosphorylation de la Na^+ , K^+ -ATPase par la PKA et la PKC ainsi qu'une tyrosine kinase phosphorylant la sous-unité α au niveau de la Tyr-10 (102). En plus de ces effets à court terme, l'insuline a également des effets à long terme sur l'expression des sous-unités de la Na^+ , K^+ -ATPase (406). D'autres hormones peptidiques participent également à la régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (105).

1.3.3 Régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase par des intermédiaires des voies de signalisations intracellulaires

1.3.3.1 Ca^{2+} intracellulaire

Le Ca^{2+} , ainsi que d'autres cations divalents tels que le Mg^{2+} , le Sr^{2+} et le Ba^{2+} , affectent l'activité de l'enzyme en bloquant l'accès des ions Na^+ à leur premier site de liaison. Ces inhibiteurs compétitifs divalents se lient à un site de liaison non spécifique se situant à proximité ou étant confondue avec le premier site de liaison des ions Na^+ de l'enzyme. (360). Ces effets sont obtenus à des concentrations élevées en Ca^{2+} .

Un autre aspect de la régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par le Ca^{2+} est dû à l'activation de certaines protéines. La calnaktine et la calmoduline affectent l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase lors de l'augmentation transitoire du $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En utilisant des globules rouges « rescelés » d'origine humaine, Yingst et ses collaborateurs ont mis en évidence une inhibition de 50% du transport du Na^+ sensible à la ouabaïne en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 1

à 5 μM (435), cette concentration étant environ 15 fois inférieure à celle utilisée pour inhiber la Na^+ , K^+ -ATPase dans des expériences utilisant des fragments membranaires. Cette différence peut s'expliquer par la présence de la calnaktine dans les globules rouges « rescelés », et qui est absente des fragments membranaires lavés. Cette protéine a un effet inhibiteur sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase et peut agir en sensibilisant la Na^+ , K^+ -ATPase à la concentration physiologique en Ca^{2+} (435). Yingst a également démontré que la calmoduline peut potentialiser l'effet inhibiteur de la calnaktine (435). D'autres études démontrent que dans certaines conditions, la calmoduline stimule l'activité Na^+ , K^+ -ATPase présente dans le cerveau de rat (332). L'addition de concentrations en Ca^{2+} submicromolaires dans un milieu dépourvu d'EDTA stimule l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase d'environ 20%. La calmoduline potentialise cet effet en accroissant l'activation de l'enzyme de 50% (331), toutefois, à des concentrations en Ca^{2+} supérieures à 10 μM , cet effet s'estompe et l'activité de l'enzyme est inhibée (332).

1.3.3.2 La protéine kinase activée par l'AMPc (PKA)

La protéine kinase activée par l'AMPc (PKA) est une kinase phosphorylant les résidus sérine ou thréonine. Son activité est déterminée par l'AMPc dont les niveaux cellulaires sont déterminés par deux enzymes, l'adénylate cyclase responsable de sa synthèse et la phosphodiesterase qui le dégrade. La PKA affecte différemment l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase et présente une spécificité tissulaire qui peut varier selon les espèces. La PKA peut stimuler l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (126), elle peut l'inhiber (116) ou n'avoir aucun effet (260). La nature de cette variabilité semble impliquer la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la PKA inhibe l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase à de faible $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Le mécanisme par lequel la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ influence l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase reste à déterminer mais il est intéressant de remarquer que les hormones activant la PKA sans augmentation concomitante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ont un effet inhibiteur sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase alors que celles qui activent la PKA et augmentent la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimulent l'activité de la pompe permettant un mécanisme de rétrocontrôle de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (65).

La régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par la PKA semble impliquer la phosphorylation directe de l'enzyme (36). Le site de phosphorylation unique se localise sur la Ser-938 (Ser 943 si l'on inclut les 5 premiers acides aminés clivés lors de la maturation de l'enzyme) dans la séquence RRNSVFQQ, située dans la partie C-terminale de la sous-unité α 1 mature de rat (112, 26). La phosphorylation de la sous-unité α par la PKA semble favorisée par la conformation E1 de l'enzyme qui facilite l'accessibilité au site de phosphorylation (111). D'autres études ont montré que la phosphorylation par la PKA joue un rôle permissif pour une phosphorylation ultérieure par la PKC sur la Ser23 (66). La régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par la PKA peut également se réaliser indirectement par l'activation de protéines intermédiaires (235) ou de la phospholipase A2 (356). Dans d'autres cas la modification de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase résulte de l'altération par la PKA de l'activité d'autres transporteurs du Na^+ (105).

1.3.3.3 La protéine kinase C (PKC)

L'activation de la protéine kinase C (PKC) est initiée par l'activation de la phospholipase C qui clive les phosphoinositides en deux composés : le phosphatidyl inositol triphosphate responsable de l'augmentation cytosolique de la concentration en Ca^{2+} , et le diacylglycérol (DAG) responsable de l'activation de la PKC. La PKC regroupe une famille d'isozymes qui diffèrent par leurs activateurs et leurs cofacteurs (265). La PKC est une kinase phosphorylant des résidus Serine et Thréonine.

L'effet de la PKC sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase peut être activateur, inhibiteur ou neutre et peut être spécifique à chaque tissu (35, 267). La nature de ces effets peut dépendre de l'isoforme PKC impliquée (319). De façon identique à la PKA, les effets de la PKC dépendent également de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (65). De plus, l'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase par la PKC peut être secondaire à une activation d'autres transporteurs du Na^+ (105). La régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase peut impliquer une phosphorylation directe de la sous-unité α (241, 222). Dans la sous-unité α 1 de rat deux résidus sérine peuvent être phosphorylés par la PKC : la Ser11 et la Ser18 (Ser 16 et Ser23, respectivement, si l'on inclut les 5 premiers acides aminés clivés lors de la maturation de l'enzyme), 80% de la phosphorylation se réalise au niveau de la Ser18 (110). Le site de phosphorylation pour la

Ser 18, KKSKK, est absent dans les sous-unités $\alpha 1$ de cochon et de chien. La Ser 11 est conservée dans l'isoforme $\alpha 2$ des vertébrés alors que l'isoforme $\alpha 3$ de rat comporte un seul site de phosphorylation potentiel similaire à la Ser18 de l'isoforme $\alpha 1$ de rat, ce site est absent dans l'isoforme $\alpha 3$ humaine (110).

Inversement à la PKA, la phosphorylation optimale par la PKC des résidus sérine se produit lorsque l'enzyme est dans sa conformation E2 (109). L'interaction entre la Na^+ , K^+ -ATPase et la PKC peut stimuler l'autophosphorylation de la PKC, celle-ci semble alors impliquer la Ser11 de la sous-unité α de la Na^+ , K^+ -ATPase et a pour conséquence une augmentation de l'activité de la kinase et de l'affinité pour le Ca^{2+} , pouvant ensuite affecter l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (111). La phosphorylation de la ser18 par la PKC est un mécanisme important de la régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase chez le rat provoquant soit un signal responsable de son endocytose (ce mécanisme d'inhibition semble dépendant de la dopamine (319)), soit un changement de conformation en faveur de E1, aboutissant à une diminution de l'affinité pour le K^+ (240). La phosphorylation de la Ser938 par la PKA semble nécessaire à la phosphorylation de la Ser18 par la PKC (111). La stimulation de la Na^+ , K^+ -ATPase observée dans certains tissus peut résulter de la phosphorylation de la Ser 11, provoquant une augmentation de l'affinité apparente pour le Na^+ (101). La phosphorylation directe de l'enzyme n'explique pas l'ensemble du processus de régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par la PKC. D'autres mécanismes impliquent l'activation d'autres transporteurs liés au Na^+ (105) ou la stimulation de la voie de la phospholipase A2 (428, 295).

1.3.3.4 Protéines du cytosquelette

Plusieurs protéines du cytosquelette telles que l'actine (217), la fodrine (278), la spectrine (200), l'adducine (408), la pasine (218) et l'ankyrine (287) ont été co-immunoprécipitées et co-localisées avec la Na^+ , K^+ -ATPase, suggérant que ces protéines interagissent soit directement, soit indirectement avec la Na^+ , K^+ -ATPase (figure 4, page 34). Ces interactions fournissent le cadre structural et la stabilité pour une localisation spatiale spécifique des Na^+ , K^+ -ATPases (61). L'ankyrine lie l'actine et la spectrine pour permettre la localisation basolatérale de la Na^+ , K^+ -ATPase dans les cellules épithéliales

Milieu extracellulaire

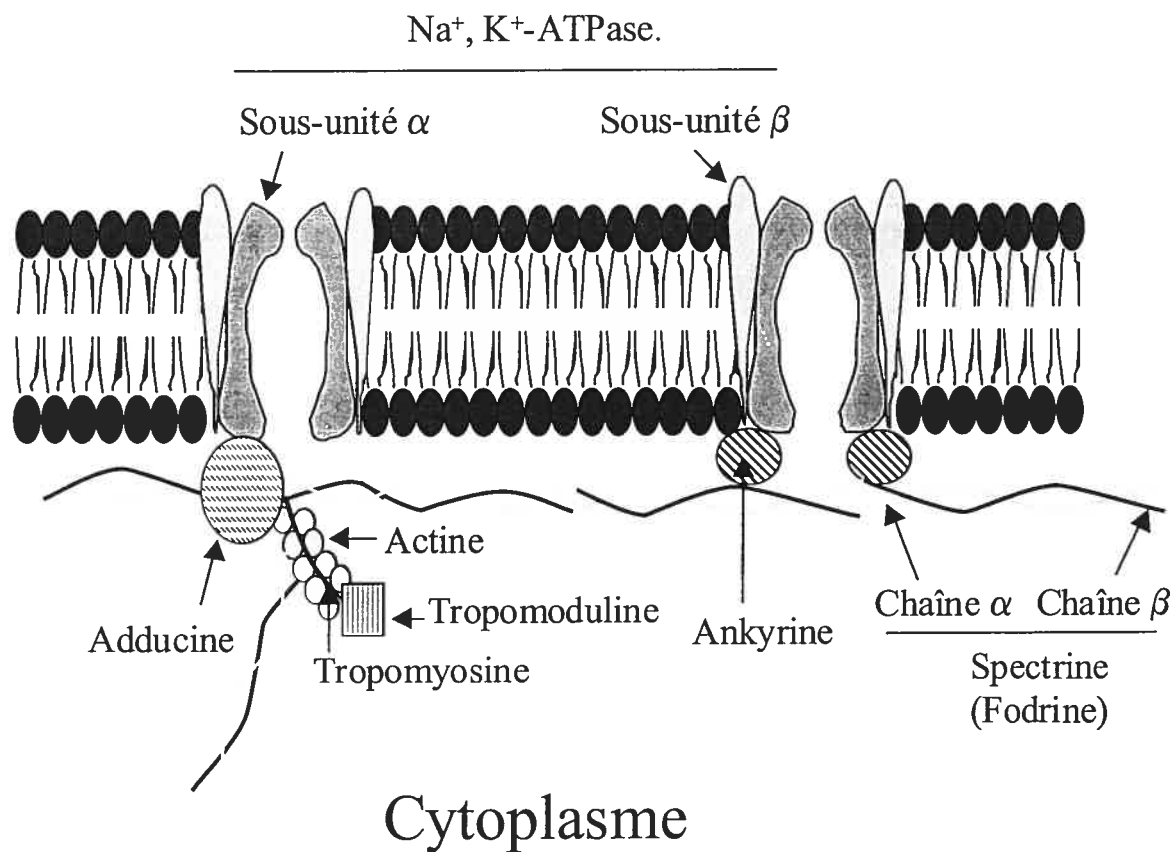


Figure 4 : Représentation schématique des protéines interagissant directement ou indirectement avec la Na⁺, K⁺-ATPase.

(287, 32). De courts fragments d'actine peuvent également interagir directement avec la Na^+ , K^+ -ATPase et stimuler son activité en augmentant l'affinité de l'enzyme pour le Na^+ de 33%. L'actine pourrait influencer la structure secondaire de l'enzyme mais sans modifier l'affinité pour le K^+ , le Mg^{2+} ou l'ATP (60). Deux sites de liaison potentiels pour l'actine ont été identifiés dans la sous-unité α et sont conservés dans les trois isoformes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (60). L'adducine peut également interagir directement avec la sous-unité α et stimuler *in vitro* l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase. Ferrandi et ses collaborateurs ont démontré que l'adducine permet une accélération de l'étape de déocclusion du K^+ , illustrée par la réaction $\text{E2(K)} \rightarrow \text{E1Na}$, à de faibles concentrations en ATP, en observant que l'effet de l'adducine est dépendant du pH et active principalement cette étape limitante de la réaction d'Albers-Post (108). Les sites de liaison de la sous-unité α impliqués dans une interaction directe avec l'adducine demeurent inconnus. L'anhydrase est également susceptible d'altérer les propriétés cinétiques de l'enzyme en modifiant la vitesse de transition entre les conformations E1 et E2 (108). L'anhydrase peut se lier à deux régions entre les segments transmembranaires 2 et 3 et 4 et 5 (441). Les effets de l'adducine et de l'anhydrase ne sont pas additifs et impliquent que ces protéines puissent interagir les unes avec les autres (108). D'autre part, l'identification de polymorphismes dans la séquence polypeptidique de l'adducine chez l'humain et le rat de souche hypertensive Milan (252) suggère que l'adducine joue un rôle déterminant dans la régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase rénale, dans des conditions normales et dans la pathogenèse de l'hypertension primaire chez l'humain et le rat (91).

1.3.3.5 Inhibiteurs circulants de la Na^+ , K^+ -ATPase

L'existence de composés digitaliques endogènes a été pour la première fois suggérée en 1885 par Ringer qui, en travaillant sur des cœurs de grenouille a noté une contraction prolongée lors de l'addition de sang à un liquide physiologique. Son hypothèse, selon laquelle cette contraction impliquerait des substances organiques (345), a été reprise par Albert Szent-Györgyi en 1953 (395). La compréhension de l'action de ces composés est venue dans un premier temps à partir des travaux de Schatzmann en 1953 (358) qui

découvrit leur effet au niveau de la dissipation des gradients du Na^+ et du K^+ , puis par les travaux réalisés par J. C. Skou en 1957 (379) qui démontra que le récepteur de ces glycosides cardiaques endogènes est la Na^+ , K^+ -ATPase.

La découverte de la présence de ces glycosides cardiaques endogènes chez les animaux est relativement récente. Une substance apparentée à la ouabaïne a été isolée à partir d'urine humaine (132), de surrénales de bovin (178) et de sang de mammifère (150). En fait, une immuno-réactivité à une substance apparentée à la ouabaïne est rencontrée dans la plupart des tissus, en incluant le plasma, mais les concentrations les plus élevées sont observées dans les surrénales, l'hypophyse et l'hypothalamus (233, 152). Ces glycosides cardiaques endogènes ont une structure similaire à la ouabaïne dérivée des plantes (203). Ce sont des stéréo- ou régio-isomères de la ouabaïne (442, 364), des dérivés des bufadiénolides (162, 363) et la ouabaïne elle-même (362). Ces glycosides cardiaques endogènes sont apparemment synthétisés dans les surrénales et libérés après une stimulation hormonale par les catécholamines et/ou l'angiotensine (89, 227). La progestérone et la pregnenolone sont des précurseurs dans la synthèse de ces glycosides cardiaques endogènes (152).

Le rôle principal de ces analogues de la ouabaïne semble être en relation avec la régulation de la pression sanguine (voir section 1.5 pour plus de détails). Les niveaux de ouabaïne endogène augmentent et déclinent rapidement lors d'un exercice physique chez l'humain, confirmant leur rôle d'hormone circulante (8). Ces composés peuvent également être impliqués dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs dans le système nerveux central et périphérique (415). Des niveaux élevés de ouabaïne endogène ont été également rapportés dans plusieurs pathophysiologies (152, 133).

1.3.3.6 Autres effecteurs

La protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) est une kinase phosphorylant des résidus sérine ou thréonine. L'activité de la PKG dépend du GMPc dont les niveaux cellulaires sont déterminés par la guanylate cyclase qui le synthétise et la phosphodiesterase du GMPc qui le dégrade. Les effets de l'augmentation du GMPc sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase sont variés (399). Les effets induits par la PKG apparaissent dans quelques cas

antagonistes de ceux induits par la PKA (399). Le processus de régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase par la PKG reste inconnu. Toutefois, une spécificité de ces effets vis à vis des isoformes α a pu être observé (327).

De plus, des kinases à sérine/ thréonine ainsi que des kinases à tyrosine sont également impliquées dans la stimulation induite par l'insuline de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase dans les cellules du tubule proximal du rein. L'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase implique une phosphorylation sur le résidu Tyr-10. La nature de cette kinase reste inconnue bien que des études suggèrent l'implication du récepteur à l'insuline (102).

Plusieurs effets des protéines kinases sur la Na^+ , K^+ -ATPase peuvent être inversés par l'activation de protéines phosphatases. Les deux phosphatases majeures impliquées dans une régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase sont la protéine phosphatase-1 (PP1), qui joue un rôle important dans la réponse à la dopamine (113), et la protéine phosphatase-2B (PP2B) ou la calcineurine impliquée dans l'activation de la Na^+ , K^+ -ATPase dans la plupart des segments du néphron par l'augmentation de l'affinité apparente pour le Na^+ (13) et pour contrer les effets inhibiteurs de la dopamine (12). D'autres protéines phosphatases participent à la régulation de la Na^+ , K^+ -ATPase comme la protéine phosphatase 2A (44) ainsi que des tyrosines phosphatases (104).

La phospholipase A2 (PLA2) est également importante dans la régulation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase. La voie de la PLA2 est régulée par la PKA et la PKC et génère des lysophospholipides et l'acide arachidonique métabolisé en eicosanoïdes. Chacun ont des effets spécifiques sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (357).

1.4 Rôle de la Na^+ , K^+ -ATPase dans la fonction de la cellule

1.4.1 Electrogénicité de la Na^+ , K^+ -ATPase

Le transfert de trois ions Na^+ vers l'extérieur en échange de l'absorption de deux ions K^+ produit un courant électrique dans lequel une charge positive nette est expulsée de la cellule. Cette propriété est appelée électrogénicité. Le potentiel membranaire généré par la Na^+ , K^+ -ATPase (E_p) dépend de deux facteurs, la densité de l'enzyme dans la membrane et la résistance électrique de la membrane (297). La Na^+ , K^+ -ATPase génère directement

une différence de potentiel à travers la membrane cellulaire. Dans des conditions physiologiques, Ep hyperpolarise la membrane cellulaire et augmente la valeur absolue du potentiel de repos. La résistance membranaire dépend de la densité et des caractéristiques des principaux canaux ioniques dans la membrane. Pour ces raisons, la contribution du pompage électrogénique de la Na^+ , K^+ -ATPase au potentiel membranaire de différentes cellules varient largement. Il existe des cellules animales dans lesquelles le potentiel membranaire de repos est généré de façon prédominante par la Na^+ , K^+ -ATPase et d'autres cellules où les flux passifs du Na^+ et du K^+ contribuent à l'établissement du potentiel de repos. Dans le premier cas, ce type de cellule a une faible perméabilité pour le K^+ , et se caractérise également par une activité importante de co- ou contre-transport déterminant l'échange ionique électroneutre net (156, 182, 56, 409). Dans la seconde catégorie de cellules, la contribution électrique directe de la Na^+ , K^+ -ATPase au potentiel membranaire est généralement faible, représentant moins de 10% du potentiel membranaire (404, 156). Dans les érythrocytes de mammifère, où les canaux anioniques sont abondants (protéine bande 3 ou échangeur anionique érythrocytaire), une inhibition totale de la Na^+ , K^+ -ATPase n'affecte pas le potentiel membranaire (299).

La nature électrogénique de la Na^+ , K^+ -ATPase permet d'une part à la Na^+ , K^+ -ATPase d'agir comme générateur de courant et de contribuer au potentiel membranaire de la cellule, et d'autre part à la vitesse de transport de devenir une fonction du potentiel membranaire (11). L'influence du courant membranaire sur le courant de pompage a été déterminée dans les membranes de nerf (404), le cœur (162), le muscle squelettique (229) et les globules rouges (268). Au niveau du mécanisme de la réaction, les contributions électrogéniques essentielles sont réalisées par la libération rapide des ions dans les étapes $\text{E2-P (3Na)} \rightarrow \dots \rightarrow \text{E2-P}$ (161, 342). Dans la conformation E1 de la Na^+ , K^+ -ATPase, jusqu'à 3 ions Na^+ se lient à deux sites chargés négativement et un site non-chargé, cette liaison du troisième Na^+ est électrogénique (161, 296). La contribution relative de la liaison intracellulaire du Na^+ à l'électrogénicité totale de la pompe ionique se situe entre 16% (296) et 30% (325). La liaison du troisième ion Na^+ est le seul événement électrogénique sur la face cytoplasmique, la liaison cytoplasmique du K^+ étant électroneutre (325). La liaison du troisième ion Na^+ n'est possible qu'après la liaison des deux premiers ions permettant de stabiliser l'enzyme dans la conformation E13Na. Cette liaison de trois ions

Na^+ permet à l'enzyme d'être phosphorylée par l'ATP, puis d'adopter une conformation E2-P dans laquelle les ions Na^+ sont successivement déocclus et libérés.

Ce changement de conformation a une très faible électrogénicité, la contribution majeure au courant transmembranaire est la libération de ce troisième ion Na^+ sur la face extracellulaire (88). La libération du premier ion Na^+ dans la phase extracellulaire est l'étape dominante de transport de charge, la cinétique de déocclusion/libération est inférieure à 1000 s^{-1} pour le premier ion et supérieure à 10^6 s^{-1} pour le dernier. L'électrogénicité réduite du second et troisième ion correspond à la valeur de la liaison du K^+ dans des conditions physiologiques (524). Le transport du K^+ est électriquement neutre, aucune charge nette n'est déplacée dans la protéine entre les états E2-P (2K^+) et E1 (88) ; (21). Seule la liaison extracellulaire (ou la libération) des ions est électrogénique (57).

Puisque la Na^+ , K^+ -ATPase est électrogénique, sa vitesse doit être affectée par le voltage. En effet, le voltage affecte le mouvement des charges (296). Des travaux préliminaires ont permis d'établir que la transition E2(2K^+) \rightarrow E1 est insensible au voltage alors que la transition E1-P (3Na^+) \rightarrow E2P est sensible (161). La liaison du Na^+ et K^+ extracellulaire sont les étapes dépendantes du voltage du cycle de la Na^+ , K^+ -ATPase. La dépendance vis à vis du voltage est influencée par la nature de l'isoforme α présente dans la Na^+ , K^+ -ATPase. Le complexe humain $\alpha 2\beta 1$ est voltage-dépendant alors que le complexe $\alpha 3\beta 1$ est pratiquement voltage indépendant. Une interprétation possible pour ces différences peut résider dans la constante de vitesse de libération du Na^+ c.à.d. une différence de liaison du Na^+ aux sites extracellulaires. Des données préliminaires indiquent que la voltage dépendance de $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ peut être principalement déterminée par la présence du Na^+ externe puisque en l'absence du Na^+ externe, la dépendance vis à vis du voltage de ces isozymes est virtuellement abolie. L'isozyme $\alpha 3\beta 1$ qui est pratiquement voltage-indépendant a également une très faible affinité pour le Na^+ externe (77).

1.4.2 Régulation du volume cellulaire

Dans les cellules vivantes, le transport des ions à travers la membrane cellulaire affecte le volume cellulaire (186). Pour maintenir leurs fonctions métaboliques, les cellules

doivent accumuler un certain nombre de substances comme des protéines, des acides aminés et des métabolites carbohydriques. Cet excès de substances organiques est contrebalancé par une concentration ionique intracellulaire plus faible.

Dans des conditions physiologiques normales, toutes les cellules ont des mécanismes pour contrer leur tendance naturelle à augmenter la tonicité intracellulaire. Ces processus passifs peuvent être interprétés en terme d'équilibre de Gibbs-Donnan (426, 228). La cellule est peu perméable au Na^+ et son exclusion permet de contrebalancer la pression osmotique exercée par les colloïdes intracellulaires selon l'hypothèse double de Donnan (249). En revanche, la membrane cellulaire est très perméable au K^+ , la sortie du K^+ de la cellule crée un potentiel membranaire extérieur positif qui conduit le Cl^- en dehors de la cellule. La faible concentration en Cl^- compense la concentration intracellulaire excessive d'anions organiques ne pouvant traverser la membrane. (272).

Dans les cellules animales, caractérisées par une membrane flexible, toute modification de l'osmolarité interne, due à une perturbation du transport transmembranaire ou un déséquilibre intracellulaire entre les précurseurs et les métabolites, est susceptible d'affecter le volume cellulaire (276). L'accumulation passive de cations est osmotiquement couplée à une entrée d'eau ; à part quelques exceptions, la membrane des cellules animales est très perméable à l'eau (248). Le mouvement de l'eau à travers la membrane cellulaire, principalement dirigé par un gradient de pression osmotique, dépend de la conductivité hydraulique de la membrane cellulaire. Cette conductivité dépend de la présence de canaux à eau, appelés aquaporines, dans la membrane cellulaire. Ces aquaporines sont importantes dans les cellules épithéliales et sont peut être exprimées dans les cellules non-épithéliales (248).

Les mécanismes impliqués dans la régulation du volume cellulaire sont séparés en deux catégories, les mécanismes de régulation à long terme et ceux à court terme. (157). L'extrusion active du Na^+ de la cellule couplée à une absorption du K^+ permet la stabilisation du volume cellulaire, ce transport actif du Na^+ implique la Na^+ , K^+ -ATPase (381). Dans des conditions isotoniques normales, la Na^+ , K^+ -ATPase représente un mécanisme de régulation à long terme du volume cellulaire (157). L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase, due à un déficit en ATP, peut éventuellement provoquer le gonflement de la cellule par la dissipation des gradients du Na^+ et du K^+ , entraînant une dépolarisation de la

membrane cellulaire et l'entrée de Cl^- dans la cellule pour maintenir l'électroneutralité, et d'eau pour maintenir l'isoosmolarité entre les cellules et le milieu. Cette inhibition s'accompagne également d'une perte de K^+ compensée par l'augmentation du Na^+ (249). Cette inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase n'aboutit pas toujours à une augmentation rapide du volume cellulaire qui peut ne pas varier ou même diminuer transitoirement (249). Ce comportement dans certaines cellules inclut la possibilité que les voies d'entrée pour le Na^+ soient régulées négativement lorsque la concentration cellulaire en Na^+ augmente. (248). Il est également possible que l'accumulation de Na^+ inhibe l'extrusion des protons, qui en équilibrant les charges négatives des anions qui ne diffusent pas, réduit la dépendance vis à vis du Na^+ et du K^+ (248).

Afin de se protéger de perturbations importantes du volume cellulaire, les cellules animales ont développé des mécanismes de régulation à court-terme, qui semblent fortement conservés (225) et impliquent principalement les systèmes de transport passif (157). Toutefois, la préexistence du gradient électrochimique établie par la Na^+ , K^+ -ATPase est cruciale pour les réponses à court-terme (157). En réponse au gonflement cellulaire, les cellules vont expulser principalement des ions K^+ et Cl^- , selon un processus appelé régulation de la diminution du volume (RDV). La RDV est associée à une inhibition des mécanismes d'absorption des ions. Au niveau de la Na^+ , K^+ -ATPase, le gonflement de la cellule peut conduire soit à son activation, par exemple dans le muscle squelettique (412) et dans plusieurs types de cellules neurales (2, 275), soit à son inhibition (411). Les systèmes de transport les plus souvent activés par le gonflement cellulaire sont les canaux anioniques et potassiques, dont l'activation est non-sélective dans plusieurs types de cellules (225). Par ailleurs, chez certains vertébrés, une perte des acides aminés et de composés relatifs tels que la taurine contribuent à la RDV (165).

En revanche, la diminution du volume cellulaire s'accompagne d'un mécanisme de régulation de l'augmentation du volume (RAV) impliquant une inhibition de la libération des ions (225). Les systèmes de transport impliqués dans l'accumulation des ions dans ces cellules sont le cotransporteur Na^+ , K^+ , 2Cl^- (123, 308) et l'échangeur Na^+/H^+ (136). Dans certaines cellules, l'accumulation des électrolytes se réalise par une activation non-sélective de canaux cationiques (63). Dans plusieurs types cellulaires, le rétrécissement est associé à

une activation de la Na^+ , K^+ -ATPase qui permet de substituer le Na^+ accumulé par le K^+ (225, 276).

Un certain nombre de facteurs est impliqué dans la régulation du volume cellulaire, mais la nature du signal sensible à une modulation du volume cellulaire et la cascade des éléments de signalisation demeurent inconnues (276).

1.4.3 Prolifération cellulaire et mort cellulaire

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération des CMLV ont été revus récemment (33). L'initiation de la prolifération de cellules quiescentes s'accompagne de changement des flux ioniques à travers la membrane plasmique (197, 256). L'activation transitoire de la Na^+ , K^+ -ATPase durant les premières minutes de l'action du mitogène est le résultat d'une augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ , due à l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ et une augmentation de l'influx de Na^+ (333, 100). En revanche, les étapes ultérieures du cycle cellulaire sont associées à une expression fonctionnelle de la Na^+ , K^+ -ATPase confinée à l'étape de croissance et précédant la synthèse d'ADN. Dans des lymphocytes humains stimulés par la phytohémagglutinine, un flux important de K^+ via la Na^+ , K^+ -ATPase précède la réponse proliférative et permet la croissance cellulaire (256). Les courants potassiques à travers les canaux K^+ dans la membrane plasmique sont requis par les cellules proliférant pour passer à travers la phase G1, les cellules humaines MCF-7 hyperpolarisent lors de la phase G1 et l'entrée en phase S (211).

La croissance cellulaire est en relation étroite avec l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase. Des travaux réalisés par Mayhew et Levinson sur des cellules ascites Ehrlich (262) puis par Lamb et McCall (224) sur des cellules de Girardi ont permis de mettre en évidence une inhibition réversible par la ouabaïne de la croissance de ces cellules en attribuant cet effet à l'inhibition éventuelle du transport des acides aminés. D'autres ont pu remarquer, lors d'une inhibition partielle prolongée de l'activité Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne, une adaptation graduelle de la vitesse de la croissance cellulaire jusqu'au niveau de celle du contrôle (79), parallèle à une augmentation du nombre de Na^+ , K^+ -ATPase à la surface membranaire (47). Une autre étude réalisée sur des lymphoblastes de souris a permis d'établir une relation entre l'inhibition de la synthèse protéique, la croissance cellulaire et la

dissipation du gradient Na^+/K^+ à travers la membrane cellulaire (372). Une explication possible à ce mécanisme d'inhibition de la croissance cellulaire est la perte du K^+ intracellulaire nécessaire à une variété de réactions enzymatiques incluant la synthèse protéique (231, 242). Toutefois dans cette même étude, le traitement des cellules par une concentration en ouabaïne de 10^{-4}M inhibe la croissance cellulaire de 43% alors que la concentration en K^+ représente 82% de celle du contrôle et la concentration en Na^+ est 5 fois plus élevée (372).

L'effet de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne est spécifique du type cellulaire. Ainsi, nous avons démontré que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase provoque une augmentation de la synthèse d'ADN et d'ARN, mais supprime la croissance cellulaire des CMLV (303), (304). Un effet similaire sur la synthèse d'ADN et d'ARN est observé dans les astrocytes mais dans ces cellules la croissance est légèrement stimulée (282). En revanche, dans les cellules S180 de sarcome (242) et les lymphocytes (392), la synthèse d'ADN et ARN sont diminuées. Cet effet de la ouabaïne sur les CMLV semble impliquer l'élévation du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ (304).

D'autre part, de faibles concentrations en ouabaïne n'ayant aucun effet sur l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase influencent également la prolifération cellulaire : dans les lymphocytes T des concentrations en ouabaïne de 10^{-8} à 10^{-7} M inhibent la prolifération cellulaire (55), alors que dans des CMLV issues de la veine saphène de chien, des concentrations en ouabaïne de 10^{-10} et 10^{-9} M activent la prolifération cellulaire (19). Ces observations suggèrent que la Na^+ , K^+ -ATPase agit également comme récepteur ou intermédiaire dans une cascade de signalisation impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire (19).

La Na^+ , K^+ -ATPase est également impliquée dans les processus apoptotiques. L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée qui élimine une population cellulaire en réponse à des stimuli déterminés dans une fenêtre de temps donnée (148, 53). La phase terminale de l'apoptose se caractérise par plusieurs marqueurs universels tels que le rétrécissement cellulaire, le clivage de la chromatine, la translocation de la phosphatidylsérine à la surface externe de la membrane plasmique et la reconnaissance par les macrophages. A l'inverse, la phase initiale de déclenchement et la progression de l'apoptose sont plus spécifiques au type cellulaire (5).

Les produits de trois gènes CED3, CED4 et CED9 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ont longtemps constitué un modèle d'étude du développement de l'apoptose (16). Ce modèle d'apoptose «instructif» qui permet au système immunitaire d'éliminer les cellules par autodestruction a permis de rechercher des homologues de ces gènes chez les mammifères. Ce modèle implique des récepteurs de mort cellulaire spécialisés comme ceux appartenant à la famille du récepteur de nécrose tumorale dont le récepteur Fas (ou CD95) est le mieux caractérisé. L'activation du récepteur Fas par un agoniste (Fas Ligand) provoque sa trimérisation au niveau de la membrane plasmique et le regroupement de ses domaines de mort intracellulaire. Cette association permet l'interaction avec une protéine adaptatrice (FADD : fas associated death domain). FADD permet le recrutement d'une cysteinyl-aspartate-protéinase spécifique initiateur appelée procaspase-8, celle-ci est l'homologue chez les mammifères de la protéine CED3 du nématode. Ce complexe multiprotéique forme le complexe inducteur de l'apoptose ou complexe DISC (death-inducing signaling complex) et provoque l'autoclivage et l'activation de la caspase-8, qui active directement les caspases effectrices, principalement la caspase-3 et la caspase-7 (figure 5, page 45) (177).

La caspase-8 active également une voie dépendante des mitochondries impliquant une libération du cytochrome c (figure 5, page 45) (220). Dans certains types cellulaires, le cytochrome c peut être nécessaire et suffisant pour l'activation de la voie apoptotique (134). Cette voie alternative d'amplification du signal apoptotique se réalise par l'intermédiaire de la caspase-9. Le cytochrome c contrôle la formation de l'apoptosome, un complexe protéique composé de la protéine Apaf1 (Apoptotic-protéase activating factor 1), homologue fonctionnel de la protéine CED4, et de la procaspase-9. La formation de ce complexe en présence d'ATP aboutit à l'activation de la caspase-9 et ensuite à celle des caspases effectrices 3, 6 et 7 (figure 5, page 45) (16). Plusieurs modèles ont été développés afin d'expliquer la libération du cytochrome c par les mitochondries. Un mécanisme potentiel implique le gonflement de la mitochondrie et la rupture de la membrane mitochondriale externe, soit par une ouverture des pores de transition de la perméabilité traversant les membranes mitochondriales interne et externe (261), soit par une

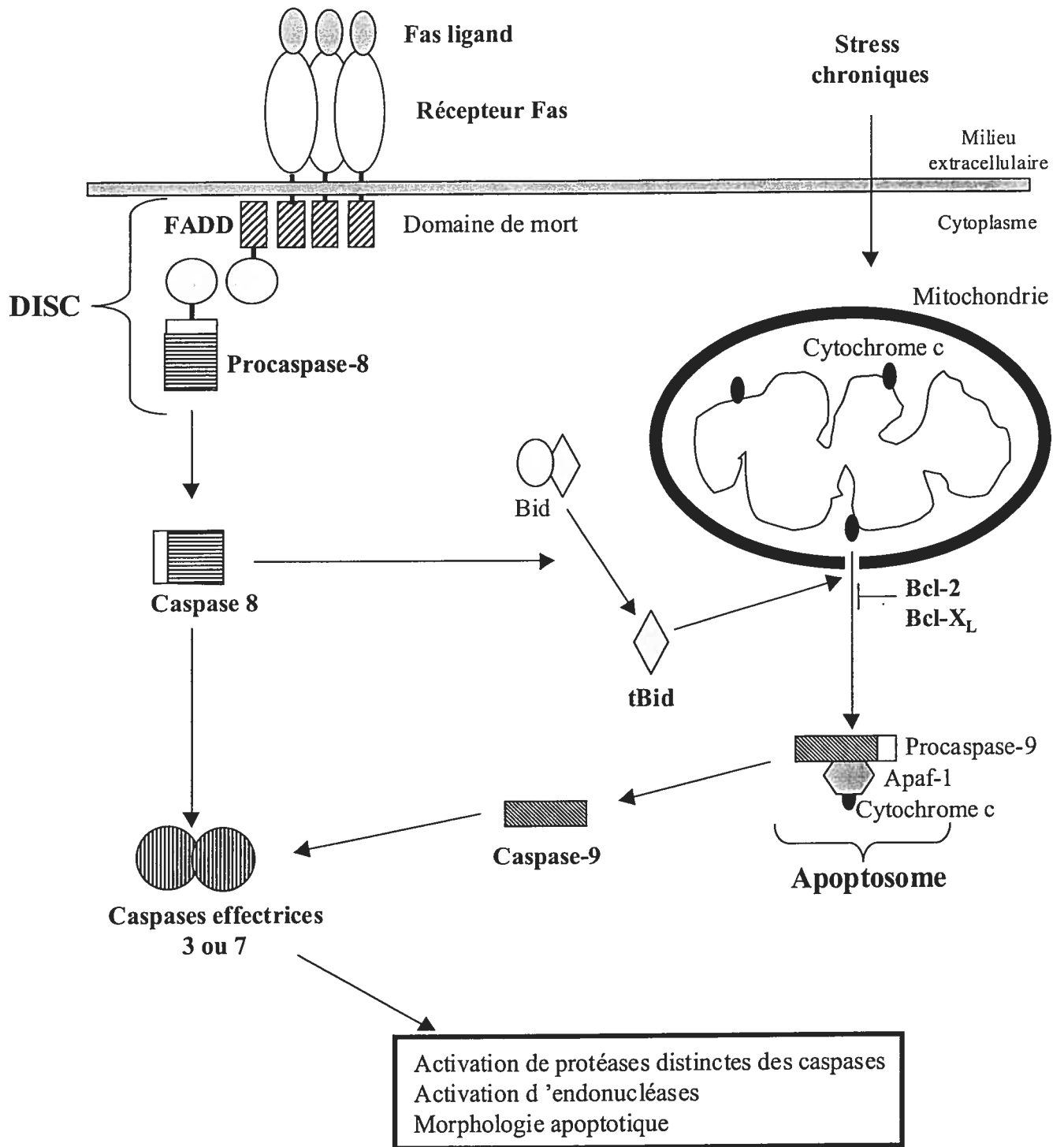


Figure 5 : Schéma représentant les systèmes majeurs impliqués dans l'induction et la progression de l'apoptose. Abréviations: (voir texte)

Adapté de Cohen, 1997 (73) ; Nuñez et al, 1998 (291) ; Eskes et al, 2000 (97)

hyperpolarisation mitochondriale de la membrane mitochondriale interne (261). D'autres modèles ne prédisent pas d'altération de l'intégrité membranaire des mitochondries lors de la phase initiale de l'apoptose, mais privilégient la formation de pores. La libération du cytochrome c semble impliquer des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 telles que Bid, Bax, Bad et Bcl-2 (261). Ces protéines sont transférées au niveau de la membrane mitochondriale et interagissent pour former des pores permettant la libération du cytochrome c (137). Plusieurs autres protéines de l'espace intermembranaire comme l'adénylate kinase, le facteur d'induction de l'apoptose (AIF : apoptosis inducing factor) responsable d'événements nucléaires indépendants des caspases et certaines caspases sont co-libérées avec le cytochrome c (213). Le processus de libération du cytochrome c mitochondrial par ces protéines lors du processus apoptotique reste controversé, un mécanisme potentiel implique une interaction entre la protéine Bid clivée (tBid) et la protéine Bax. La protéine Bid localisée dans le cytoplasme est un substrat de la caspase 8 activée, le clivage de Bid (tBid) provoque son transfert au niveau de la membrane mitochondriale externe où elle s'associe à d'autres protéines pour initier la libération du cytochrome c (figure 5, page 45) (137). L'interaction provoque le changement de conformation de la protéine Bax qui s'oligomérisse et s'insère dans la membrane mitochondriale externe (97), Bax pourrait alors déstabiliser l'organisation de la membrane externe, favorisant la formation de pores (24). La protéine Bax peut également se lier directement au canal anionique voltage-dépendant (VDAC ou porine). Cette protéine est l'une des composantes du pore de transition de perméabilité qui se forme au site de contact entre les membranes mitochondriales interne et externe (375). Cette libération du cytochrome c par la protéine Bax est associée à une perte du potentiel mitochondrial transmembranaire (375).

Ces fonctions pro-apoptotiques peuvent être bloquées par des homologues de la protéine CED9, Bcl-2 et Bcl-X_L, ces protéines se lient aux protéines Bax et Bak et bloquent leurs effets pro-apoptotiques en formant des hétérodimères (10). Le clivage de la protéine Bid favorise également son hétérodimérisation avec des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X_L, en prévenant l'activité inhibitrice que ces protéines exercent sur la libération de la protéine Apaf1 (68) ou la formation de pores, en réprimant l'activité du canal anionique voltage-dépendant (375). L'activation du processus apoptotique peut

également dépendre de stress chroniques, et les marqueurs cellulaires de l'apoptose sont identiques à ceux observés dans le cas d'une activation du processus de mort cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ayant un domaine de mort cellulaire (50, 405, 95). En revanche, les étapes initiales aboutissant à l'activation des caspases diffèrent et sont encore peu connues.

Le rétrécissement cellulaire est une caractéristique de l'apoptose (205) mais l'importance de ce phénomène dans le processus apoptotique n'est pas encore déterminée. Il est possible que les flux ioniques observés (plusieurs études ont démontré l'implication d'un efflux de K^+ (53, 22)) et les changements du volume cellulaire facilitent l'apoptose sans être absolument essentiels, apparaissant comme des amplificateurs du processus (138). Toutefois d'autres études suggèrent le contraire et soulignent l'importance de ces flux ioniques et du volume cellulaire dans les processus apoptotiques (300, 51).

Le processus apoptotique est spécifique au type cellulaire et au moins 4 types différents d'apoptose ont été répertoriés (144). Dans les cellules Jurkat, l'induction de l'apoptose par CD95 permet l'activation des caspases critiques pour l'efflux de K^+ des cellules (289). En revanche, d'autres études montrent que l'efflux de K^+ est impliqué dans l'activation des caspases (306, 52), les concentrations physiologiques en K^+ inhibent effectivement l'activation des nucléases, de la caspase-1 (419) et de la caspase-3 (173). La Na^+ , K^+ -ATPase semble inhibée de manière réversible dans les cellules Jurkat apoptotiques et potentialise l'efflux de K^+ dans le processus apoptotique, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase seule n'ayant aucun effet sur le volume de ces cellules (289). Plusieurs éléments peuvent influencer l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase de façon réversible comme la phosphatidyl-sérine (337) qui est relocalisée au niveau de la membrane externe dans les cellules apoptotiques, l'actine et d'autres protéines du cytosquelette ainsi que la PKC (289).

La conséquence de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase sur la survie cellulaire est spécifique à chaque type de cellule. L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase peut également provoquer la nécrose des cellules. La nécrose se distingue de l'apoptose par des caractéristiques morphologiques et biochimiques : elle débute par le gonflement de la cellule et du contenu mitochondrial puis par une vacuolisation du cytoplasme, un clivage irrégulier de l'ADN nucléaire et finalement par la rupture de la membrane cellulaire et la lyse de la cellule (250). Le traitement de cellules provenant du rein de chien Madin-Darby

(MDCK) par 100 μM de ouabaïne pendant 20 h provoque la mort de ces cellules (48). Les cellules MDCK sont hétérogènes et se composent de cellules principales appelées C7 et de cellules intercalées appelées C11. Une étude récente utilisant également des cellules MDCK C7 et C11 incubées pendant 24 h en présence de 3 μM de ouabaïne permet d'observer une mort massive de ces deux types de cellule (318). L'analyse des marqueurs de la mort cellulaire confirme un processus nécrotique indépendant de l'inhibition des flux ioniques et de l'inversion du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$. Ces données suggèrent également que le signal nécrotique est provoqué par le changement de conformation de la sous-unité α après interaction avec la ouabaïne (318).

A l'inverse des observations faites précédemment sur l'induction par la ouabaïne d'un processus de mort cellulaire par nécrose, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne bloque la progression du processus apoptotique dans les CMLV provenant de l'aorte de rat mâle (306). La préincubation des CMLV avec 1 mM de ouabaïne diminue fortement le nombre de cellules apoptotiques après 6 h d'incubation dans un milieu dépourvu de sérum. L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase prévient la dégradation de l'ADN en échelle apoptotique et n'augmente pas la libération de la lactate déshydrogénase, un marqueur de la nécrose cellulaire. Un effet similaire est observé en incubant les CMLV dans un milieu pauvre en K^+ , alors que dans un milieu riche en K^+ , la ouabaïne ne protège pas les CMLV de l'apoptose induite par la déprivation en sérum. L'effet de la ouabaïne est également indépendant d'une modification du volume cellulaire puisque l'incubation des CMLV dans un milieu hyperosmotique n'affectant pas l'activité de la caspase-3 ou le clivage de la chromatine. D'autre part, l'étude de l'activation de la caspase-3 démontre que le prétraitement des CMLV par la ouabaïne est suffisant pour diminuer son activité basale d'environ 5 fois et pour abolir l'augmentation de l'activité de la caspase-3 après induction de l'apoptose. Toutefois, l'activité de la caspase-3 n'est que légèrement inhibée par une augmentation de la force ionique (10 à 20%), suggérant que l'inhibition de l'activité de la caspase-3 est indirecte (306). Cette étude démontre que l'inversion du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ bloque l'apoptose des CMLV en amont de l'activation de la caspase-3. Par la suite, d'autres études réalisées dans d'autres types de cellule ont également permis d'observer que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase bloque le processus apoptotique (443, 181). Dans les cellules tubulaires proximales rénales de porc, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase provoque

l'activation de la PI3 Kinase et d'Akt qui peuvent être impliqués dans la réponse anti-apoptotique (443). Dans des cellules de granule cerebellaire, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne protège les cellules de l'apoptose induite par des faibles concentrations en K^+ (181).

L'analyse d'autres inhibiteurs physiologiquement importants de l'apoptose dans les CMLV a permis de démontrer que l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC retarde le développement de l'apoptose. De façon similaire à la ouabaïne, l'inhibition se réalise en amont de l'activation de la caspase-3 (305). Toutefois, les articles considérés dans cette thèse démontrent que les mécanismes moléculaires de l'inhibition de l'apoptose par l'AMPC et la ouabaïne sont différents.

1.4.4 Expression des gènes et voies intracellulaires de signalisation

La Na^+ , K^+ -ATPase intervient dans la régulation de l'expression génique. En effet, l'influence d'une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ sur l'expression des sous-unités de la Na^+ , K^+ -ATPase a été suggérée par Boardman et ses collaborateurs (46). Par la suite, de nombreux travaux ont pu démontrer que l'inhibition prolongée de la Na^+ , K^+ -ATPase par de faibles concentrations en K^+ dans le milieu extracellulaire ou par des glycosides cardiaques tels que la ouabaïne aboutit à une augmentation de l'ARNm codant pour les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la Na^+ , K^+ -ATPase, mais aussi pour des protéines impliquées dans l'assemblage du cytosquelette (actine et kinase de la chaîne légère de la myosine), pour la communication entre les cellules (ANF et TGF- β) et pour des gènes de réponse primaire (Tableau IV, page 50). L'expression de l'actine et des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la Na^+ , K^+ -ATPase sont complètement abolies par la présence d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN (284, 171), indiquant une augmentation de l'expression de ces gènes plutôt qu'une diminution de la vitesse de la dégradation de l'ARNm. Une augmentation de 6 à 10 fois de la synthèse *de novo* de l'ARN total est également observée dans les CMLV traitées à la ouabaïne (303).

L'augmentation du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ peut limiter la vitesse de la synthèse protéique en raison de la nécessité pour la machinerie ribosomique d'une concentration élevée en K^+ lors du transfert d'un acide aminé à la chaîne polypeptidique en formation (242). Ces données suggèrent que l'augmentation de la synthèse d'ARN lors de l'inhibition

Tableau IV : Gènes dont l'expression est augmentée lors de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase.

Type de cellules	Identité de l'ARNm (activation)	Méthode pour inhiber la Na^+ , K^+ -ATPase (temps d'incubation)	Référence
Sous-unités de la Na^+, K^+-ATPase			
Hépatocyte de rat	$\alpha 1$, $\beta 1$ (4 et 2)	Faible quantité de K^+_{ext} (24 h)	(335)
Cardiomyocyte de rat	$\alpha 1$, $\beta 1$ (2 et 3)	Faible quantité de K^+_{ext} (72 h)	(339)
Cardiomyocyte de rat	$\beta 1$ (1,5)	Faible quantité de K^+_{ext} (12 h)	(444)
Cardiomyocyte de rat	$\beta 1$ (3)	Ouabaïne (12 h)	(216)
NRK	$\alpha 1$, $\beta 1$ (3)	Ouabaïne (12 h)	(284)
Gènes de réponse primaire			
Cellule leucémique humaine	c-Fos (>30)	Ouabaïne (24 h)	(290)
Cellule de mélanome humain	c-Fos (6)	Ouabaïne (3 h)	(285)
MDCK	c-Fos (1,5)	Ouabaïne (1,5 h)	(189)
IMCD-3	c-Fos (5)	Ouabaïne (1,5 h)	(189)
Rein de rat, cortex, papille	c-Fos, Erg-1 (AE)	Ouabaïne (1,5 h)	(189)
Rein de rat, médulla	c-Fos, Erg-1 (2-3)	Ouabaïne (1,5 h)	(189)
Fibroblaste humain	c-Fos (6)	Ouabaïne (3 h)	(286)
Cellule de mélanome humain	c-Fos (5)	Ouabaïne (5 h)	(286)
Cellule HeLa	c-Fos (3)	Ouabaïne (16 h)	(286)
Cardiomyocyte de rat	c-Fos (45)	Ouabaïne (0,5 h)	(321)
Cardiomyocyte de rat	c-Fos (8)	Ouabaïne (0,5 h)	(429)
Hépatocyte de rat	c-Fos (8)	Faible quantité de K^+_{ext} (0,5 h)	(62)
Cardiomyocyte de rat	c-Jun (6)	Ouabaïne (0,75 h)	(321)
Lymphocyte T humain	c-Jun (5)	Ouabaïne (16 h)	(371)
Cellule PC12 de rat	c-Myc	Ouabaïne (12 h)	(7)

Divers			
Cardiomyocyte de rat	MCL-2 (3)	Ouabaïne (12 h)	(172)
Cardiomyocyte de rat	TGF- β	Ouabaïne (12 h)	(172)
Cardiomyocyte de rat	Actine squelettique	Ouabaïne (12 h)	(172, 429)
Cardiomyocyte de rat	ANF	Ouabaïne (12 h)	(172, 429)

Abréviations : AE : aucun effet, ANF : facteur natriurétique atrial, Erg-1 : facteur de croissance « early growth response gene 1 », IMCD-3 : cellule épithéliale des canaux collecteurs de souris, MDCK : cellule canine de rein Madin-Darby, MLC-2 : myosine chaîne légère-2, TGF- β : facteur de croissance transformant beta.

de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne ne se concrétise pas obligatoirement par une augmentation de la traduction. En effet, le traitement des CMLV par la ouabaïne provoque une forte élévation de la synthèse d'ARN mais n'affecte pas la synthèse protéique totale (303). Toutefois, plusieurs études ont rapporté une augmentation de la synthèse protéique des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ (54, 397), ainsi que des protéines c-Fos et c-Jun (voir chapitre 3).

Les mécanismes impliqués dans l'activation de l'expression de ces gènes peuvent être générés par la dépolarisation membranaire, par l'élévation de la $[\text{Na}^+]_i$, ou par la diminution de la $[\text{K}^+]_i$. Dans les cellules épithéliales de rein de rat, l'accumulation de l'ARNm des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ est indépendante de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ou d'une diminution du pH_i , et semble impliquer la $[\text{Na}^+]_i$ dans une régulation directe de l'expression des gènes codant pour la Na^+ , K^+ -ATPase (284). Des études utilisant des CMLV de rat traitées à la vératridine, un activateur des canaux Na^+ sensibles au voltage, mettent également en évidence une augmentation de la transcription des gènes codant pour les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ et localisent une région sensible au Na^+ dans la partie 5' du promoteur du gène codant pour la sous-unité $\alpha 1$ (431). D'autres études ont permis de définir des régions sensibles au Na^+ dans le promoteur de la sous-unité $\alpha 1$ (431), de la sous-unité $\alpha 2$ (349), de la sous-unité $\beta 1$ (339, 444) ou du gène *c-fos* (286). Cependant, malgré ces observations, il n'existe aucune démonstration directe de la régulation de ces gènes par des changements de la $[\text{Na}^+]_i$ ou de la $[\text{K}^+]_i$.

Dans plusieurs types de cellules excitables, l'élévation de la $[\text{Na}^+]_i$ est accompagnée d'une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soit par l'activation de canaux calciques dépendants du voltage, soit par l'activation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Dans des myocytes cardiaques néonataux de rat traités à la ouabaïne, l'ARNm de c-Fos est augmenté d'environ 20 fois après 2 h d'incubation avec une concentration en ouabaïne de 0,1 mM. Dans ces cellules, l'effet de la ouabaïne est complètement aboli dans un milieu dépourvu de Ca^{2+} (321), en présence d'un chélateur calcique intracellulaire (BAPTA) (321), d'un inhibiteur de la PKC (H7) (215) ou d'un antagoniste de la calmoduline (W7) (215). Ces données suggèrent que l'activation de l'expression de c-Fos dans ces cellules est directement dépendant de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ce mécanisme d'expression génique est défini comme un couplage excitation-transcription (6). Ce mécanisme semble contribuer à l'altération du profil d'expression de

c-Fos dans des artères fraîchement isolées de rat qui constituent un modèle génétique de l'hypertension sensible au sel (425).

L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase peut également affecter plusieurs systèmes de signalisation indépendants de la $[\text{Na}^+]_i$ ou de la $[\text{K}^+]_i$, avec une spécificité variant en fonction de l'espèce considérée et de la cellule étudiée (tableau V, page 54). Ainsi, dans les myocytes cardiaques de rat, l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par la ouabaïne peut être à l'origine de l'activation de la protéine Ras et des MAPKs p42/p44 qui, par l'intermédiaire de la calmoduline et de la PKC, participent à l'activation des protéines impliquées dans l'hypertrophie comme c-fos, le facteur atrial natriurétique (ANF) et l' α -actine squelettique, et à la répression de la sous-unité $\alpha 3$ de la Na^+ , K^+ -ATPase (215, 273). L'inhibition des MAPKs p42/p44 diminue de 30% l'effet de la ouabaïne sur l'expression de la protéine c-Fos et de l'ANF et abolit l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\alpha 3$ (215). En revanche dans ces cellules traitées à la ouabaïne, la vitamine E ou la N-acétyl cystéine, deux inhibiteurs de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), n'affectent pas l'expression de c-Fos mais bloquent l'induction de l'expression de l'ANF et de l' α -actine squelettique ainsi que l'inhibition de l'expression de $\alpha 3$ (429). Ces ROS interviennent comme seconds messagers dans le contrôle de la transcription de certains gènes (429). La génération de ROS est indépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et de la $[\text{Na}^+]_i$ et semble cibler le facteur de transcription $\text{NF}\kappa\text{B}$, régulant l'expression des gènes tardifs impliqués dans l'hypertrophie cardiaque (238).

Ces données suggèrent que dans les myocytes cardiaques, l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a un rôle ubiquitaire alors que l'implication des autres voies de signalisation telles que ROS ou MAPK est plus spécifique. Toutefois, d'autres données indiquent que cette élévation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est nécessaire mais pas suffisante pour induire l'hypertrophie et la régulation des gènes associés. En fait, les effets précoces de l'interaction de la ouabaïne avec de la Na^+ , K^+ -ATPase sont indépendants des changements des concentrations intracellulaires en Na^+ , K^+ et Ca^{2+} mais dépendent de l'interaction de l'enzyme avec d'autres protéines (141, 238). La Na^+ , K^+ -ATPase est liée à la voie Ras/MAPK par l'intermédiaire de la kinase Src et du récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR). La ouabaïne induit la translocation de Src au niveau membranaire, la Src activée interagit avec EGFR et provoque sa

Tableau V : Données sur l'implication de la Na⁺, K⁺-ATPase dans la signalisation intracellulaire.

Type de cellule et moyen utilisé pour inhiber la Na ⁺ , K ⁺ -ATPase (temps d'incubation)	Voie de signalisation intracellulaire (activation)	Références
Cardiomyocyte de rat, ouabaïne 0,1 et 1mM (15 min)	[Ca ²⁺] _i (2 et 7)	(321)
Cardiomyocyte de rat, ouabaïne 0,1 mM (30 min)	MAPK-p42/p44 (3)	(215, 141)
CMLV de rat, ouabaïne 1 mM (6 h)	MAPK-p42/p44, JNK, p38 (AE)	(303)
Cellules HeLa, ouabaïne 1 mM (30 min)	MAPK-p42/p44 (2), JNK (5), p38 (8)	(234)
CMLV canin, ouabaïne 1 nM (15 min)	MAPK-p42/p44 (2-3)	(18)
Cardiomyocyte et CMLV de rat, ouabaïne 0,1 mM (5 min)	Phosphorylation de résidu tyrosine dont le récepteur à EGF (3-4)	(141)
Cardiomyocyte et CMLV de rat, ouabaïne 0,1 mM (5 min)	Protéine kinase src (2)	(141)
Cardiomyocyte et CMLV de rat, ouabaïne 0,1 mM (5 min)	Activité Ras (3)	(215)
CMLV canin, ouabaïne 1 nM (5 min)	Phosphorylation de résidu tyrosine dont le récepteur à EGF (3-4)	(18)
Cardiomyocyte de rat, ouabaïne 0,1 mM (30 min)	Production de ROS (10)	(429, 238)

Abréviations : AE : aucun effet, CMLV : cellule de muscle lisse vasculaire, EGF : facteur de croissance épidermique, MAPK-p42-44 : « Mitogen Activated Protein Kinase » de 42 et 44 kDa, ROS : espèces réactives de l'oxygène, protéine kinase src : protéine kinase du sarcome de souris.

transactivation par phosphorylation. Cette phosphorylation constitue le point d'ancrage pour d'autres protéines telles que SHc, Sos, Grb-2 et Ras (141). Dans les CMLV de chien, de faibles concentrations en ouabaïne (0.1-1 nM) induisent la prolifération de ces cellules via l'activation de la cascade des éléments de signalisation Src, EGFR, MAPKs (18). Toutefois de faibles concentrations en K^+ (1-4,5 mM), inhibant partiellement l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase ne reproduisent pas les effets de la ouabaïne, suggérant un mécanisme unique indépendant de l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase et probablement lié à la conformation de l'enzyme (18). La contribution relative du $[Na^+]_i$, du $[K^+]_i$ ou celle d'un changement de conformation de la Na^+ , K^+ -ATPase comme signal initial de l'expression génique n'a pas encore été établi, ce sujet constituant un intérêt particulier dans notre étude (voir chapitre 3).

1.5 Implication dans la pathogenèse de l'hypertension

Jusqu'à 20% des individus habitants dans les pays développés ont une élévation de la pression sanguine, l'hypertension est un des facteurs de risque les plus importants pour le développement des maladies cardiaques, vasculaires cérébrales, rénales et vasculaires périphériques (280). Plusieurs causes monogénétiques de l'hypertension ont été identifiées, mais dans la plupart des cas, la maladie est polygénique et a un caractère hétérogène. L'impact environnemental, représentant environ 2/3 de la variance de la pression sanguine, semble s'exercer au niveau d'une modification phénotypique additive aux effets de l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la pression sanguine (146).

Une analyse détaillée réalisée par Guyton et ses collaborateurs a démontré que parmi les nombreux facteurs affectant la régulation de la pression sanguine, seulement deux systèmes peuvent être considérés comme des servomécanismes pour une maintenance à long terme d'une pression sanguine élevée (140). Le premier de ces deux mécanismes est un réajustement de la fonction rénale permettant une homéostasie eau/sels normale en dépit d'une élévation chronique de la pression sanguine. Le second mécanisme est une augmentation de la résistance vasculaire provoquée par une altération de la contractilité des vaisseaux sanguins et/ou d'une altération de leur géométrie périphérique. Cette propriété

des vaisseaux a été appelée remodelage, associé à une hypertrophie ventriculaire gauche (155).

Des recherches sur les causes de l'hypertension ont permis de mettre en évidence le caractère constant de l'augmentation de la résistance périphérique chez les individus hypertendus (280). L'importance de la structure vasculaire dans la régulation de la pression sanguine a été démontrée chez des humains hypertendus (115). Dans les modèles animaux d'hypertension essentielle tels que le rat spontanément hypertendu (SHR), des changements similaires de la structure des petites artères ont été déduits ou observés (114). Un déséquilibre entre la prolifération et l'apoptose des CMLV est considéré comme la base du remodelage vasculaire (145, 149, 147). L'apoptose est augmentée dans le coeur, le cerveau, les reins et les artères de rats hypertendus où la mort des cellules de muscle lisse module le remodelage vasculaire (180). Une augmentation de la prolifération et de l'apoptose a été mise en évidence dans les CMLV de rat spontanément hypertendu (142, 149). Ces études suggèrent que le remodelage vasculaire observé dans l'hypertension peut être provoqué par des propriétés intrinsèques des CMLV plutôt qu'une exposition à long terme à des milieux hypertenseurs (pour une revue récente voir (307)).

Les données présentées dans la section 1.4.3 démontrent que l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase affecte la prolifération et la mort cellulaire. De plus, la Na^+ , K^+ -ATPase est un transporteur majeur permettant la réabsorption du Na^+ à travers la membrane basolatérale de l'épithélium rénal. En considérant ces données, la Na^+ , K^+ -ATPase a été soumise à des analyses dans plusieurs formes d'hypertension expérimentale. Différents travaux ont permis de mettre en évidence 60 à 80% d'augmentation de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase dans des fractions membranaires du cortex du rein de rat de souche Milan hypertendu, par rapport à la souche Milan normotendu (266, 315). Cette différence n'est pas liée à une augmentation du nombre de sites de liaison de la ouabaïne mais attribuée à une altération de la Na^+ , K^+ -ATPase ou l'une des voies de régulation de son activité (315).

Des comparaisons de séquences de la sous-unité $\alpha 1$ de la Na^+ , K^+ -ATPase provenant de rein entre des rats Dahl sensibles au sel et des rats Dahl résistants au sel ont permis de mettre en évidence la substitution unique d'un acide aminé Gln par un résidu Leu en position 276 dans la sous-unité α (160). La vitesse du transport du Na^+ est essentiellement la même chez les rats Dahl sensibles et Dahl résistants en revanche le

transport du K^+ est réduit chez les rats Dahl sensibles, avec une capacité d'échange de 3 ions Na^+ pour 1 ion K^+ , suggérant une augmentation du rapport Na^+/K^+ dans ces cellules (59). Des modèles mathématiques suggèrent que cette augmentation du rapport Na^+/K^+ est suffisante pour augmenter la vitesse de réabsorption du Na^+ et d'eau dans le tubule proximal du rein dans l'hypertension sensible au sel (311). Par ailleurs, un locus pour l'hypertension ou « quantitative trait loci » (QTL) pour la pression sanguine a été défini sur le chromosome 2 du rat, la sous-unité $\alpha 1$ de la Na^+, K^+ -ATPase apparaissant comme le gène candidat le plus proche de cette région (344, 84, 354). Deux lignées de rats congéniques ont été réalisées dans nos laboratoires, afin d'affiner la cartographie des gènes de ce QTL pour la pression sanguine, par la substitution d'un segment chromosomique de la souche Dahl SS/JR sensible au sel comportant le gène *atplal* codant pour la sous-unité $\alpha 1$ de la Na^+, K^+ -ATPase, par un segment chromosomique homologue de la souche Milan normotendue. Des comparaisons de l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase confirment que ni l'activité, ni la stoechiométrie de la sous-unité $\alpha 1$ de la Na^+, K^+ -ATPase ne sont affectées par la substitution des allèles en dépit d'une diminution de la pression sanguine. Ces données suggèrent que *atplal* ne soit pas un gène candidat pour le QTL pour la pression sanguine (307).

Dans d'autres cas, l'augmentation de l'activité de ces transporteurs ioniques est associée à une mutation d'une composante du cytosquelette. Le rôle des protéines du cytosquelette dans la régulation de la Na^+, K^+ -ATPase a été décrit dans la section 1.3.3.4. Chez des rats génétiquement hypertendus de souche Milan, le développement de l'hypertension est lié à un défaut rénal primaire, qui consiste en une augmentation de la réabsorption tubulaire du Na^+ , associée à une augmentation basolatérale de l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase. Cette augmentation de l'activité Na^+, K^+ -ATPase semblerait impliquer une protéine du cytosquelette, l'adducine (108).

Dans la section 1.3.2, nous avons considéré des données montrant que l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase est soumise à une régulation par de nombreux stimuli externes, incluant les facteurs endogènes apparentés à la ouabaïne (FEAO). Des études réalisées durant la dernière décennie ont démontré que la production des FEAO est augmentée dans des formes d'hypertension humaine et expérimentale associées à une expansion du volume du fluide extracellulaire (pour revue voir (106)). Ainsi, l'administration chronique de ouabaïne

aboutit graduellement au développement de l'hypertension chez le rat (254). De plus, l'immunisation de rats contre la ouabaïne diminue la pression sanguine artérielle (152). Les niveaux plasmatiques des facteurs endogènes apparentés à la ouabaïne (FEAO) sont augmentés chez environ 50% des patients ayant une hypertension essentielle (255). Plusieurs études ont pu démontrer que les FEAO sont augmentés dans plusieurs modèles d'hypertension expérimentale, comme chez des animaux ayant une diète riche en Na^+ , ainsi que chez l'humain. Toutefois d'autres études n'observent aucune variation du niveau de ces FEAO (253). Les niveaux circulants de FEAO augmente spécifiquement durant une diminution sévère du Na^+ et une restriction en sels chronique, suggérant que ce stéroïde soit impliqué dans une adaptation physiologique à la rétention du Na^+ (253). Les niveaux circulants de ouabaïne sont directement corrélés à la pression sanguine moyenne, l'épaisseur relative de la paroi du ventricule gauche du coeur et l'index de résistance périphérique totale (323, 255). Cependant l'effet hypertensiogénique de ces dérivés de la ouabaïne augmente avec la diminution de leur potentiel inhibiteur de la Na^+ , K^+ -ATPase, suggérant que l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase ne soit pas la cible initiale par laquelle les FEAO induisent une augmentation de la pression sanguine (voir section 1.4.4).

M.P. Blaustein (40) a été le premier à proposer le rôle d'une élévation de la production de FEAO dans l'altération de l'homéostasie ionique associée à l'hypertension. D'après ce modèle, une augmentation de la réactivité vasculaire est probablement une cause et non une conséquence de l'hypertension parce qu'elle est également observée chez des individus normotendus avec une prédisposition génétique à l'hypertension (41). L'augmentation du tonus vasculaire pourrait être le résultat d'une légère augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans les CMLV. Cette augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]$ serait la conséquence d'une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ due à la présence dans la circulation de niveaux élevés de FEAO sécrétés par les glandes surrénales et inhibiteurs spécifiques de la Na^+ , K^+ -ATPase (42). Les niveaux circulants des FEAO augmentent de 30 à 200% dans plusieurs formes d'hypertension dont l'hypertension essentielle (151, 430, 131). Ces inhibiteurs circulants de la Na^+ , K^+ -ATPase peuvent augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par l'intermédiaire d'une activation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Dans les CMLV, les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont présentes mais différent par leur affinité pour la ouabaïne et par leur localisation cellulaire. La distribution de la sous-unité $\alpha 1$ est ubiquitaire et son affinité pour la ouabaïne est relativement faible, en

revanche l'isoforme $\alpha 3$ est confinée dans une région du plasmalemme (le plasmerosome) qui est adjacente au réticulum sarco/endoplasmique. Cette distribution est analogue à celle de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (196, 14). L'isoforme $\alpha 3$ a une forte affinité pour la ouabaïne et pour les composés apparentés à la ouabaïne (151). Cette compartimentation fait que les concentrations en $[\text{Na}^+]_i$ et $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diffèrent de celles du cytoplasme et l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via une élévation de la $[\text{Na}^+]_i$, l'inhibition de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et l'activation de la libération du Ca^{2+} stocké dans le RE se réalisent dans la région du plasmerosome (14).

Une autre hypothèse, développée par Leenen et ses collaborateurs, suggère que les FEAO agissent sur le système nerveux central et provoquent l'excitation du système nerveux sympathique et l'hypertension par l'altération du baroréflexe (168, 170). Des analogues de la ouabaïne ont également été isolés dans l'hypothalamus et sont présents dans l'hypophyse et les neurones médullaires. Chez des rats conscients, une injection intracérébroventriculaire de ouabaïne, d'extraits hypothalamiques ou d'hypophyse contenant une activité apparentée à la ouabaïne provoquent une augmentation de l'activité sympathique, de la pression sanguine et de la vitesse des battements du coeur (167). L'activité des FEAO est plus importante chez des rats spontanément hypertendus (SHR) que chez des rats normotendus Wistar Kyoto (WKY) (230). Chez des rats normotendus, l'administration centrale de la ouabaïne ou d'extraits de cerveau provoque une excitation sympathique et une augmentation de la pression sanguine identiques. Ces effets sont bloqués par des anticorps, fragments Fab, dirigés contre la ouabaïne (167).

1.6 Hypothèse et Objectifs du travail de recherche

Les premières études réalisées chez des animaux puis chez l'humain ont démontré que l'hypertension se caractérise par une augmentation de la résistance périphérique attribuée au remodelage des vaisseaux sanguins (280). Le remodelage vasculaire est considéré comme un processus d'adaptation en réponse à des changements chroniques des conditions hémodynamiques. Il est généralement associé à une réduction du diamètre de la lumière des vaisseaux sanguins et à une augmentation du rapport lumière/média (148, 30, 280). Le remodelage vasculaire se caractérise donc par un déséquilibre entre la prolifération

et l'apoptose des CMLV (145, 147). Les mécanismes impliqués dans ces processus restent par certains aspects énigmatiques.

Toutefois, des travaux réalisés dans plusieurs types cellulaires, dont des CMLV provenant de rongeurs avec une hypertension expérimentale, ont mis en évidence des perturbations au niveau du Na^+ intracellulaire, dues à l'altération de transporteurs du Na^+ situés dans la membrane plasmique ainsi qu'à l'augmentation de la production dans l'organisme d'inhibiteurs endogènes circulants de la Na^+ , K^+ -ATPase (145, 363, 253, 151, 41). Des études récentes ont permis d'observer que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne ou de faibles concentrations en K^+ et l'activation de la voie de l'AMPC dans des CMLV sont suffisantes pour permettre l'inhibition transitoire du développement du processus apoptotique, induit une déprivation en sérum, et que cette inhibition se réalise en amont de l'activation de la caspase-3 (305, 306).

L'activation de la voie de signalisation de l'AMPC induit l'expression de gènes contenant dans leur promoteur l'élément de réponse au Ca^{2+} -AMPC (CRE) (135, 434). Récemment, un autre mécanisme de régulation de l'expression génique par la PKA indépendant de l'AMPC mais impliquant l'endothéline-1, un peptide vasoactif, a été documenté par Dulin et ses collaborateurs (90, 82). Nous avons démontré que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne provoque une synthèse massive d'ARN (303). Plusieurs gènes dont l'expression est activée lors de l'inhibition prolongée de la Na^+ , K^+ -ATPase ont été révélés dans ces études considérées dans la section 1.4.4. Ainsi, les objectifs spécifiques des études menées sont les suivants :

- 1- Examiner le rôle de l'expression génique dans l'inhibition de l'apoptose par la voie de signalisation de l'AMPC et de la ouabaïne.
- 2- L'identification des gènes de réponse primaire dont l'expression est augmentée par l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase dans les CMLV, ainsi que les mécanismes responsable de cette activation.
- 3- En utilisant une approche protéomique, identifier les gènes dont l'expression est impliquée dans l'inhibition de l'apoptose en présence d'un rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ élevé.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis

Taurin S, Ryazhsky GG, Maximova NV, Chuchalin AG, Hamet P,
Pshezhetsky AV, Orlov SN

Biochemistry (Moscow), 2002 Fev;67(2):254-9

**Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is
not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of
apoptosis**

**S. Taurin¹, G.G. Ryazhsky², N.V. Maximova^{2*}, A.G. Chuchalin¹, P. Hamet¹,
A.V. Pshezhetsky¹, S.N. Orlov^{1,2*}**

¹University of Montreal Research Center, Quebec, Canada

*²Laboratory of Physical Chemistry of Biomembranes, School of Biology, Lomonosov
Moscow State University, Moscow, 119899 Russia; fax: (095) 939-1116; Email:*

[REDACTED]

Key words: apoptosis, cAMP, RNA synthesis, protein synthesis

*Correspondence and requests for reprints to Dr. Sergei N. Orlov at Centre de recherche,
CHUM - Hôtel-Dieu, 3850 St. Urbain, Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada

Tel: (514) 890-8000 ext 12925; **Fax:** (514) 412-7152

e.mail: **[REDACTED]**

ABSTRACT

The elevation of intracellular cAMP content is accompanied by expression of genes whose promoter contains a Ca²⁺-cAMP responsive element. In vascular smooth muscle cells (VSMC), activation of cAMP signaling blocks apoptosis triggered by serum deprivation. In the present study we investigated the role of gene expression in the inhibition of apoptosis by cAMP. IN VSMC, transfected with E1A adenovirus, incubation in the absence of serum for 6 h led to 20-fold elevation of chromatin fragmentation and 10-fold activation of caspase-3 activity, these being employed as markers of apoptosis. Forskolin-induced activation of cAMP-signaling was accompanied by 50% elevation of RNA synthesis and completely abolished the development of apoptosis during the initial 6 h incubation in growth factor-free medium. In 12 h apoptosis forskolin-treated VSMC was slowly developed and after 24 h the content of chromatin fragments was 2-fold less than in control cells. Addition of actinomycin D and cycloheximide completely blocked RNA synthesis and decreased protein synthesis by 80%, respectively. Neither compound affected baseline apoptosis or its inhibition by forskolin. More than 70 newly phosphorylated proteins were observed by 2D-electrophoresis of VSMC after incubation with forskolin for 3 h; in 24 h the number of phosphoproteins triggered by forskolin was decreased by 2-3 fold. These results show that suppression of VSMC apoptosis under activation of cAMP signaling is mediated via posttranslational modification of pre-existing intermediates of the apoptotic machinery rather than by de novo synthesis of inhibitors of programmed cell death.

INTRODUCTION

Initial stages of programmed cell death (apoptosis) possess tissue specific features that are lost at the terminal (universal) stages during activation of specific proteases (caspases). This is important for the development of pharmacological approaches for correction of diseases (e.g., Alzheimer's and Parkinson's diseases) characterized by premature cell death or accumulation of "unwanted" cells that appear during malignant conversion or tissue hypertrophy. Long-term maintenance of increased blood pressure and atherosclerosis and accompanied by vascular wall hypertrophy [1-4]. We earlier investigated the role of signal systems in the development of apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC). We found that in contrast to immune system cells, VSMC are less sensitive to agonists of so-called death receptors (FAS-ligand, TNF- α); however, these cells undergo apoptosis in growth factor medium. Addition of the low-selectivity protein kinase inhibitor staurosporine and the highly selective inhibitors of serine/ threonine phosphatases caliculin and okadaic acid also induced apoptosis of VSMC [5]. Activation of the cAMP signaling system [6] or increase of intracellular $[Na^+]/[K^+]$ ratio [7] attenuated the development of apoptosis of VSMC at the stage preceding caspase-3 activation. However, systems involved in the protection of cells against apoptosis are tissue-specific. For example, Na^+/K^+ -ATPase inhibitors exhibit the antiapoptotic effect in VSMC and neuronal cell culture [8], but they were ineffective in immune system cells pretreated with FAS-ligand [7]. Antiapoptotic effect of activators of cAMP signaling was noted in neutrophils [9], hepatocytes [10], and neuronal and endothelial cells [12] but not in T-lymphocytes [13], moreover, in thymocytes activation of cAMP signaling stimulated apoptosis [14]. The antiapoptotic effect of Na^+/K^+ -ATPase inhibitors on VSMC was abolished by adding inhibitors of RNA and protein syntheses [15]. Taking into consideration data on the sharp increase of [3H]uridine incorporation into RNA fraction [15] and identification (by 2D-electrophoresis) of newly synthesized proteins [16], it was suggested that slowing VSMC death at the increase intracellular $[Na^+]/[K^+]$ is mediated by activation of expression of genes encoding apoptosis inhibitor. In many cell types cAMP increase is accompanied by expression of genes containing a Ca^{2+} -cAMP response element (CRE) in their promoter [17-19]. Transfection of neuronal cells with CRE-binding protein (CREB) protected them

against okadaic acid-induced apoptosis [20]. This effect may be attributed to increase expression of the gene encoding the antiapoptotic protein bcl-2; its promoter contains CRE [21]. Antiapoptotic protection of hepatocytes by activation of cAMP-signaling requires the presence of inhibitors of RNA synthesis [10]. In the present study we investigated the effect of adenylate cyclase and forskolin on RNA synthesis in VSMC and also effects of inhibitors of RNA and protein syntheses on the development of apoptosis during activation of cAMP-dependent signaling.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture. Vascular smooth muscle cells were isolated from aortas from male Sprague-Dawley rats as described previously [22]. The resulting cells were transfected with E1A adenovirus by Dr M. R. Bennett (University of Cambridge, UK). In contrast to intact VSMC, which are rather resistant to apoptosis triggers, from 30 to 50% E1A-transfected cells (VSMC-E1A) undergo apoptosis after the incubation in growth factor-free medium for 4-6 h [23]. Therefore, these cells are convenient model for pharmacological analysis of the role of signal systems in the triggering and inhibition of apoptosis.

Detection of apoptosis. The development of apoptosis in VSMC-E1A was monitored by the accumulation of chromatin fragments [24]. Briefly, cells grown in 24-well plates for 24 h in DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium) containing 10% calf serum and 1 μ Ci/ml [3 H]thymidine were washed and incubated in the medium without radiolabeled thymidine for 48 h. Apoptosis was initiated by transfer of the cells into the serum-free medium containing additions listed in the tables. After the incubation medium was collected for radioactivity counting (A_1) cells were lysed in the cold with 10 mM tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.5% Triton X-100 for 15 min. The resulting lysate was centrifuged for 10 min at 10000 rpm; the supernatant was used for radioactivity counting (A_2). The sediment and remaining cells (in wells) were treated with 10% SDS and 4 mM EDTA and were also used for radioactivity counting (A_3). Relative content of intracellular chromatin fragments was determined as $A_2 \times (A_1 + A_2 + A_3)^{-1} \times 100\%$. In previous studies we demonstrated that this method is very convenient for quantitative evaluation of apoptosis and the data obtained well corresponded to analysis of DNA fragments, phosphatidylserine accumulation on the external surface of plasma membrane, and also to morphological analysis of the content of apoptotic cells [6, 7, 25]. In the other series the development of apoptosis was evaluated by caspase-3 activity measured by the rate of cleavage of the fluorescence-labeled selective substrate of this enzyme: Asp-Glu-Val-Asp-AMC. Caspase-3 activity was measured in the absence and in the presence of the selective inhibitor of this enzyme Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (1 μ M) [6].

Synthesis of RNA and protein was determined by incorporation of [3 H]uridine and [3 H]leucine, respectively [26-27]. The effect of RNA and protein synthesis inhibitors on

cell viability was evaluated by the proportion of Trypan blue stained cells. Cell suspension obtained after the treatment with 0.05% trypsin in Mg^{2+} - and Ca^{2+} -free medium was treated with 0.2% Trypan blue. The total number of cells and the number of trypan blue stained cells were determined using hemacytometer.

Protein content was determined by the Lowry method [28].

Identification of phosphorylated proteins using 2D-electrophoresis. Cells (VSMC-E1A) grown in flasks (85 cm²) were preincubated in phosphate-free DMEM containing 10% serum and ³²Pi (200 μCi/ml) for 3 h. After this pretreatment the incubation medium was substituted for standard DMEM containing 10% serum, and the cells were incubated in the presence or absence of forskolin for 3 or 24 h. Cells were then washed four times with cold 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM NaCl and lysed in 600 μl of medium containing 8 M urea, 20 mM tributyl phosphine, 50 mM thiourea, 40 mM Tris, and 4% CHAPS. The resulting samples were applied onto lanes with nonlinear pH gradient (pH= 3-10) Immobiline (Pharmacia, Sweden) and subjected to isoelectrofocusing in a Protean AEF system (Biorad, USA) followed by subsequent electrophoresis (for 16 h) in 8-16% polyacrylamide gel (10 mA) using the Protean II system (Biorad). Gels were fixed in the mixture 50% methanol/10% acetic acid and dried under vacuum. Phosphorylated proteins were developed by radioautography and analysed using PD Quest software (Biorad).

Chemicals. [³H]Thymidine, [³H]uridine, [³H]leucine and ³²P-orthophosphate were purchased from Amersham (Canada). Other chemicals were obtained from Sigma (USA), BIOMOL (USA), and Gibco (USA).

RESULTS

We previously found that incubation of VSMC-E1A in growth factor-free medium for 3-6 h is accompanied by rapid triggering of apoptosis [6, 7, 23, 25]. The results of the present study are consistent with the previous observations. Figure 1 shows that incubation of VSMC-E1A in growth factor (serum)-free medium for 6 h was accompanied by significant increase in chromatin fragments from 2 to 25-30% (Figure 1, curve 2). Forskolin addition completely abolished the effect of serum deprivation on the accumulation of chromatin fragments during incubation for 6-12 h; after the incubation for 24 h the content of chromatin fragments in forskolin-treated cells was two-times less than in control cells (Figure 1, curves 3 and 2, respectively). Previously we found that besides forskolin, the activation of cAMP signaling by β -adrenoreceptor agonists, cholera toxin (Gs protein activator) phosphodiesterase inhibitor and cAMP analog, 8-Br-cAMP, also inhibited apoptosis in VSMC [6].

Transient apoptosis in cells with an activated cAMP-dependent signaling system may be a consequence of expression of genes encoding apoptosis inhibitor. It is also possible that this effect is due to involvement of protein kinase A in the phosphorylation of pre-existing regulators of the apoptotic machinery leading to modification of their activity. To test these alternative hypotheses, we compared effects of adenylate cyclase activator (forskolin) on apoptosis in the presence and absence of inhibitors of RNA synthesis (actinomycin D (Act-D)) and protein synthesis (cycloheximide (CHX)), respectively. In accordance with previous observations in other cell types [18-19], the incubation of VSMC-E1A with forskolin for 2 h caused an increase of RNA synthesis (by 50-60%) (Table I). Pretreatment with Act-D for 30 min was accompanied by 100-fold reduction of RNA synthesis in VSMC-E1A and complete abolishment of the effect of forskolin. Pretreatment with CHX caused 6-7-fold reduction of [3 H]leucine incorporation into the protein fraction of VSMC-E1A. Neither Act-D nor CHX influenced the development of apoptosis measured by accumulation of chromatin fragments in cells subjected to incubation in growth factor-free medium (serum deprivation) for 6 h (Table II). Similar results were obtained during assay of caspase-3 activity (Table III). Neither compound influenced the number of Trypan blue

stained cells (table I). This suggests lack of toxic effect of the short-term inhibition of protein and RNA syntheses.

To test the possible role of cAMP-dependent protein phosphorylation in modulation of apoptosis we investigated the content of phosphorylated proteins in VSMC-E1A treated with forskolin for 3 and 24 h. Forskolin completely abolished the development of apoptosis during incubation for 6 h; the antiapoptotic effect of forskolin was reduced during longer incubation (12 h) (figure 1). Results 2D-electrophoresis of ^{32}P -labeled cells indicate that incubation with forskolin for 3 h was accompanied by phosphorylation of more than 70 proteins of molecular masses ranging from 15 to 200 kD and *pI* from 3.2 to 9.5 (figure 2b); after the incubation with forskolin for 24 h, the number of phosphorylated proteins was reduced to 20-30 (figure 2c).

DISCUSSION

Previous studies revealed that the activation of cAMP signaling system and the increase of intracellular ratio of Na^+/K^+ by Na^+/K^+ -ATPase inhibitors caused transient inhibition of apoptosis in VSMC at the stage preceding caspase-3 activation [6-7]. Inhibitors of RNA and protein synthesis abolished the effect of Na^+/K^+ -ATPase inhibitors on the development of apoptosis [15]. The latter suggests that inhibition of apoptosis by inversion of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ is realized by the activation of some $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ -sensor (S) followed by subsequent expression of an unidentified inhibitor of apoptosis (INH) (Figure 3). It was also noted that the inhibition of Na^+/K^+ -ATPase in hepatocytes [29], lymphocytes [30], fibroblasts [31] and cardiomyocytes [32] was accompanied by sharp increase of c-fos and c-jun mRNA. The role of these and other ERG as possible triggers of expression of apoptosis inhibitor in VSMC (figure 3) are currently being investigated in our laboratory.

Results of the present study clearly indicate that in contrast to Na^+/K^+ -ATPase inhibitors the inhibition of apoptosis during activation of cAMP-dependent signaling is accompanied by moderate increase of $[\text{H}^3]$ uridine incorporation into RNA fraction (table I) and does not depend on the presence of inhibitors of RNA and protein synthesis (tables II and III). This suggests that the antiapoptotic effect of cAMP is not related to the expression of genes encoding an inhibitor of programmed cell death. Results of the present study also suggest that cAMP-dependent inhibition of apoptosis involves activation of protein kinase A. This may have two possible consequences: inhibition of activity of apoptosis triggers (ACT~P) or activation of inhibitors of apoptotic machinery ((INH~P)*, figure 3). This is consistent with the following data: 1) transfection of catalytic subunit of protein kinase A inhibited apoptosis of VSMC-E1A [6]; 2) addition of protein kinase A inhibitors attenuated antiapoptotic effect of activators of cAMP-signaling system [6]; 3) transient apoptosis inhibition by forskolin (figure 1) correlated with kinetics of protein kinase A activation [6] and protein phosphorylation (Figure 2).

As in the case of other cell types, inhibitors of phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase attenuated the protective effect of growth factors against the development of apoptosis in VSMC [5, 33]. Serine/threonine protein kinase B (ACT) is one of the substrates of PI3

kinase. Recently it was found that phosphorylation of a serine and threonine residue of bcl-2 significantly increased its antiapoptotic function [34-35], whereas Bad phosphorylation reduced efficacy of this protein as a trigger of apoptosis [36]. Bad [36] and procaspase-9 [37] are phosphorylated by ACT *in vivo*. In various cell types protein kinase A activates ACT via PI3 kinase-dependent [10] and –independent mechanism [38]. However, it should be noted that in hepatocytes protection against apoptosis by activation of cAMP-signaling system does not involve ACT activation [10]. The role of this cascade leading to phosphorylation of Bad and procaspase-9 and also the role of phosphoproteins visualized by 2D-electrophoresis (figure 2) in the inhibition of apoptosis during activation of cAMP-dependent signaling in VSMC requires further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from Canadian Institutes for Health Research (MT-10803) and Russian Foundation for Basic Research.

REFERENCES

1. Hamet, P. (1995) *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.*, **4**, 1-7.
2. DeBlois, D, Orlov, S.N., and Hamet, P. (1999) in *Apoptosis in cardiac biology* (Schunkert, H., ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston Doredrecht-London, pp 213-222.
3. Bennett, M.R., Littlewood, T.D., Schwartz, S.M., and Weissberg, P.L. (1997) *Circ Res.*, **81**, 591-598.
4. Geng, Y.L. (1997) *Heart and Vessels*, **12**, 76-80.
5. Orlov, S.N., DeBlois, D., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) *Cardiovasc. Risk Factors*, **9**, 67-79.
6. Orlov, S.N., Thorin-Trescases, N., Dulin, N.O., Dam, T.-V., Fortunato, M.A., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) *Cell Death Differ.*, **6**, 672-691.
7. Orlov, S.N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S.V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 16545-16552.
8. Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Halle, A., Harms, C., Lautenschlager, M., Weih, M., Dirnagl, U., Victorov, I.V., and Zorov, D.B. (2000) *Neurosci. Lett.*, **283**, 41-44.
9. Parvathenani, L.K., Buescher, E.S., Chacon-Cruz, E., and Beebe, S.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6736-6743.
10. Li, J., Yang, S., and Billiar, T.R. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 13026-13034.
11. Galli, G., Meucci, O., Scorziello, A., Werge, T.M., Calissano, P., and Schettini, G. (1995) *J. Neurosci.*, **15**, 1172-1179.
12. Polte, T., and Schroder, H. (1998) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **251**, 460-465.
13. Sciorati, C, Rovere, P., Ferrarini, M., Helta, S., Manfredi, A.A., and Clementi, E. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 23211-23215.
14. Suzuki, K., Takaduma, T., and Kizaki, H. (1991) *Cell. Immunol.*, **134**, 235-240.
15. Orlov, S.N., Taurin, S., Thorin-Trescases, N., Dulin, N.O., Tremblay, J., and Hamet, P. (2000) *Hypertension*, **35**, 1062-1068.
16. Taurin, S., Orlov, S.N., Seyrantepe, V., Hamet, P., and Pshezhetsky, A.V. (2000) *Can. J. Cardiol.*, **16**, 153F.

17. Tamai, K.T., Monaco, L., Nantel, F., Zazopoulos, E., and Sassone-Corsi, P. (1997) *Recent Prog. Hormone Res.*, **52**, 121-139.
18. Yao, H., York, R.D., Misra-Press, A., Carr, D.W., and Stork, P.J.S. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8240-8247.
19. Grieco, D., Porecllini, A., Avvedimento, E.V., and Gottesman, M.E. (1996) *Science*, **271**, 1718-1723.
20. Wilson, B.E., Mochon, E., and Boxer, L.M. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5546-5556.
21. Walton, M., Woodgate, A.M., Muravlev, A., Xu, R., During, M.J., and Dragunow, M. (1999) *J. Neurochem.*, **73**, 1836-1842.
22. Orlov, S.N., Tremblay, J., and Hamet, P. (1996) *Am. J. Physiol.*, **270**, C1388-1397.
23. Bennett, M.R., Evan, G.I., and Schwartz, S.M. (1995) *Circ. Res.*, **77**, 266-273.
24. Orlov, S.N., Dam, T.V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1996) *Biochem Biophys Res. Commun.*, **221**, 708-715.
25. Champagne, M.J., Dumas, P., Orlov, S.N., Bennett, M.R., Hamet, P., and Tremblay, J. (1999) *Hypertension*, **33**, 906-913.
26. Andrawis, N.S., and Abernethy, D.R. (1993) *Am. J. Med.*, **306**, 137-140.
27. Giasson, E., Servant, M.J., and Meloche, S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 26879-26886.
28. Hartee, E.I. (1972) *Analyt. Biochem.* **48**, 422-427.
29. Cayanis, E., Russo, J.J., Wu, Y., and Edelman, I.S. (1992) *J. Membr. Biol.*, **125**, 163-170.
30. Olej, B., dos Santos, N.F., Leal, L., and Rumjanek, V.M. (1998) *Biosci. Rep.*, **18**, 1-7.
31. Nakagawa, Y., Rivera, V., and Lerner, A.C. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 8785-8788.
32. Peng, M., Huang, L., Xie, Z., Huang, W.-H., and Askari, A. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 10372-10378.
33. Bai, H., Pollma, M.J., Inishi, Y., and Gibbons, G.H. (1999) *Circ. Res.*, **85**, 229-237.
34. Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T., and Dzau, V.J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 19022-19026.
35. Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 11671-11673.
36. Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997) *Cell*, **91**, 231-241.

37. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frish, S., and Reed, J.C. (1998) *Science*, **282**, 1318-1321.
38. Filippa, N., Sable, C.L., Filloux, C., Hemmings, B., and van Obberghen, E. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4989-5000.

Figure 1 : Kinetics of accumulation of intracellular chromatin fragments in VSMC transfected with E1A-adenovirus and incubated in growth factor-free medium : 1) control (incubated with 10% calf-serum); 2) serum-free medium; 3) serum-free medium +10 μ M forskolin. Total content of 3H-labeled DNA was defined as 100%. The data are the means of four measurements.

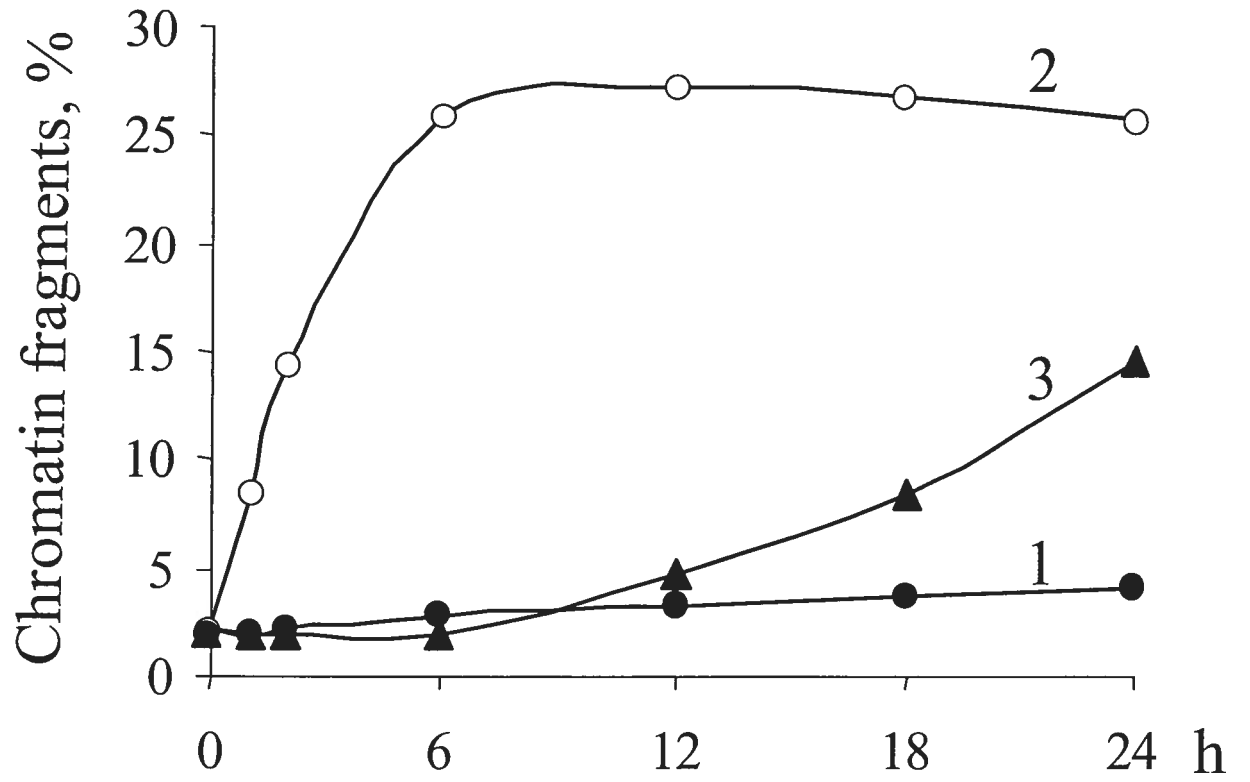


Figure 2 : Effect of forskolin on protein phosphorylation in VSMC transfected E1A adenovirus : a) proteins phosphorylated under control conditions (10% calf serum, no forskolin); b) proteins phosphorylated after incubation with forskolin (10 μ M) for 3 h; c) proteins phosphorylated after incubation with forskolin (10 μ M) for 24 h; pI and M_r of phosphoproteins are give on abscissa and ordinate, respectively.

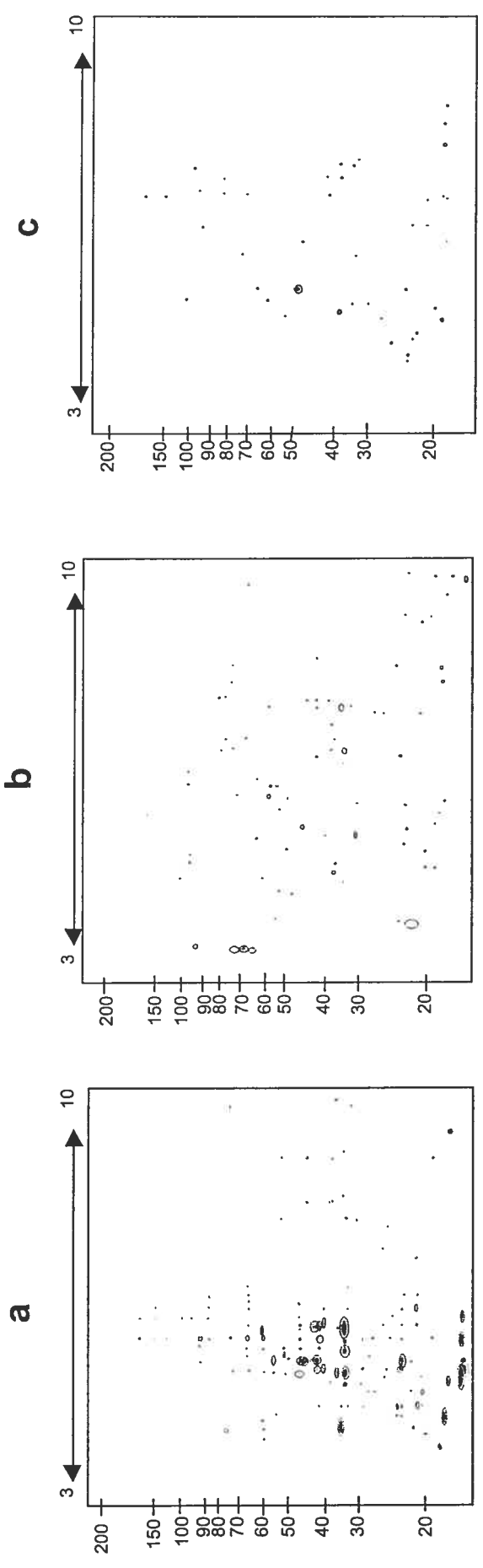


Figure 3. Possible mechanisms of involvement of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ and cAMP in the inhibition of apoptosis in VSMC. S, sensor generating a signal during increase in intracellular $[Na^+]/[K^+]$; prom, promoter; ERG, early response genes; inh, gene encoding apoptosis inhibitor; PKA, protein kinase; A; ACT~P and INH~P, phosphorylated forms of activator and inhibitor of apoptosis; *, activated state of proteins; + and -, stimuli leading to activation and inhibition of the signal cascade, respectively; ?, unidentified component of the signal cascade. Other details are given in the text.

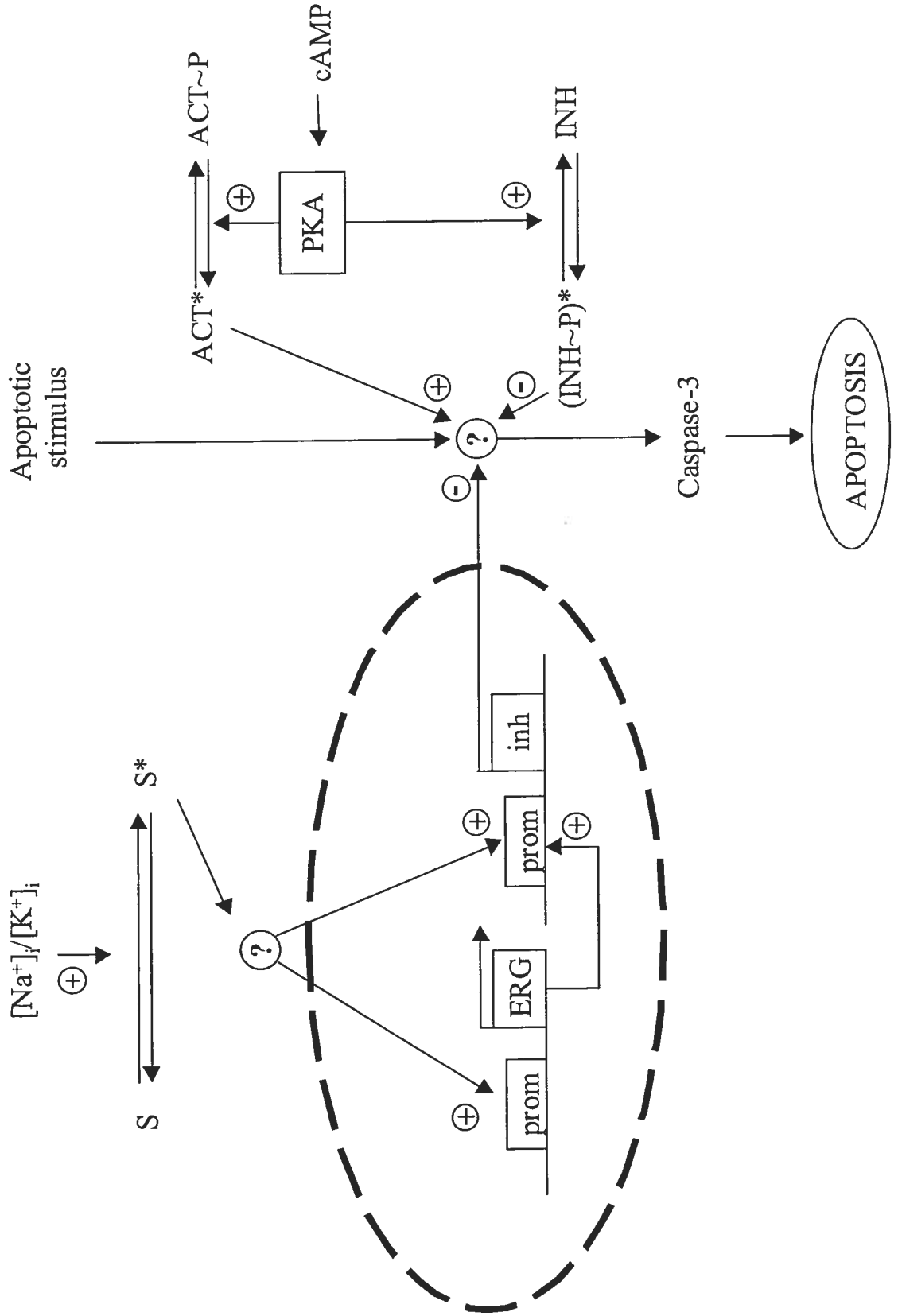


Table I. Effect of actinomycin D and cycloheximide on synthesis of RNA and protein synthesis of RNA and protein and viability of VSMC transfected with E1A adenovirus.

Additions to incubation medium, $\mu\text{g/ml}$	RNA synthesis, cpm/mg protein		Protein synthesis, cpm/mg protein	Trypan blue stained cells, %
	control	forskolin		
Control	43876 \pm 3412	69344 \pm 5733	8754 \pm 988	5.6 \pm 0.7
Actinomycin D, 2	471 \pm 68*	418 \pm 177*	2538 \pm 311*	6.4 \pm 0.5
Cycloheximide, 2	9213 \pm 700*	10287 \pm 1075*	1313 \pm 98*	6.6 \pm 1.1

Note: VSMC-E1A cells were cultivated in the presence of 10% calf serum. Rates of RNA and protein syntheses were evaluated by incorporation of [^3H]uridine and [^3H]leucine (1 $\mu\text{Ci/ml}$); the radiolabeled compounds were added 2 h before termination of cell incubation. Actinomycin D and cycloheximide were added 30 min before addition of forskolin (10 μM) and isotopes. Trypan blue stained cells are given as percent of total number of cells. Data represent the mean \pm SD of four measurements.

* $p < 0.001$ compared to control

Table II. Effect of forskolin, actinomycin D, and cycloheximide on apoptosis in VSMC-E1A measured by accumulation of intracellular chromatin fragments.

Additions to incubation medium, $\mu\text{g/ml}$	Content of chromatin fragments, %					
	medium with 10% serum		Serum-free medium			
	control	forskolin	control	forskolin	control	forskolin
Control	2.4 \pm 0.3	1.9 \pm 0.2	28.7 \pm 3.6	3.3 \pm 1.0**		
Actinomycin D, 2	3.3 \pm 0.6	2.1 \pm 0.3	25.4 \pm 2.0	4.0 \pm 0.5**		
Cycloheximide, 2	3.6 \pm 0.4	2.0 \pm 0.3*	26.0 \pm 2.7	3.8 \pm 0.4**		

Note: VSMC-E1A cells prelabeled with [^3H]thymidine were cultivated in the presence of 10% calf serum, then the cells were incubated for 6 h in the presence or absence of serum and 10 μM forskolin. Actinomycin D and cycloheximide were added 30 min before addition of forskolin. Total content of ^3H -labeled DNA was defined as 100%. Data represent mean SD of four measurements.

* $p < 0.02$

** $p < 0.001$ compared to cells incubated without forskolin

Table III. Effect of forskolin, actinomycin D, and cycloheximide on the activity of caspase-3 measured in VSMC-E1A cells.

Additions to incubation medium, $\mu\text{g/ml}$	Caspase-3 activity, nmole/h per mg protein					
	medium with 10% serum			Serum-free medium		
	control	forskolin		control	forskolin	
Control	0.42 \pm 0.16	0.31 \pm 0.10		4.7 \pm 1.2	0.55 \pm 0.11*	
Actinomycin D, 2	0.38 \pm 0.12	0.33 \pm 0.11		4.1 \pm 0.9	0.48 \pm 0.17*	
Cycloheximide, 2	0.40 \pm 0.13	0.35 \pm 0.09		5.0 \pm 1.1	0.44 \pm 0.14*	

Note: VSMC-E1A cells were cultivated in the presence of 10% calf serum, then the cells were incubated for 6 h in the presence or absence of serum and 10 μM forskolin. Actinomycin D and cycloheximide were added 30 min before addition of forskolin. Data represent mean SD of four measurements.

* $p < 0.001$ compared to cells incubated without forskolin

Résumé

L'activation de la voie de signalisation de l'AMPC ou l'augmentation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ bloque le développement du processus apoptotique dans les CMLV, à une étape précédant l'activation de la caspase-3. Des études réalisées précédemment ont montré que l'effet anti-apoptotique des inhibiteurs de la Na^+ , K^+ -ATPase est abolie par l'addition d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN et des protéines. L'étude présentée dans cet article s'intéresse aux mécanismes anti-apoptotiques impliqués dans la voie de signalisation de l'AMPC.

La suppression transitoire de l'apoptose lors de l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC dans les cellules peut impliquer une activation de l'expression de protéine anti-apoptotique ou la modification post-traductionnelle par phosphorylation de régulateurs préexistants de l'apoptose. Dans plusieurs types cellulaires, l'augmentation de l'AMPC active l'expression de gènes contenant un élément de réponse au Ca^{2+} -AMPC (CRE) dans leur promoteur. Deux heures d'incubation des CLMV-E1A, une lignée de CMLV infectée par le virus E1A et très sensible à l'apoptose, avec la forskoline, un activateur de la voie de l'AMPC, provoque une augmentation de la synthèse d'ARN d'environ 50 à 60%. L'addition d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN et des protéines, actinomycine D et cycloheximide, diminue d'environ 100 fois la synthèse d'ARN dans ces cellules et abolit complètement l'effet de la forskoline sur la synthèse d'ARN ; la synthèse protéique étant réduite de 6 à 7 fois. Toutefois, ni l'actinomycine D, ni la cycloheximide n'influencent l'inhibition du développement de l'apoptose par la forskoline.

La forskoline inhibe complètement l'apoptose durant environ 6h. Une incubation prolongée diminue l'efficacité de l'effet anti-apoptotique, après 24 h d'incubation, l'apoptose n'est plus diminuée que de 50%. Une étude par électrophorèse bi-dimensionnelle du profil de phosphorylation du protéome démontre un plus grand nombre de protéines phosphorylées après 3 h d'incubation (70 protéines) par rapport à avec celles retrouvées après 24 h d'incubation (20-30 protéines).

Ces données démontrent clairement que l'inhibition de l'apoptose durant l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC n'est pas due à la synthèse *de novo* d'inhibiteurs du processus apoptotique. Ces résultats suggèrent que cette inhibition est essentiellement due à

l'activation de la protéine kinase A et à la phosphorylation de protéines préexistantes. Cette phosphorylation peut impliquer soit l'inactivation d'activateurs comme Bad, soit l'activation d'inhibiteurs comme Bcl-2.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2

c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells: from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium mediated, calcium-independent mechanism

Sebastien Taurin, Nickolai O. Dulin, Dimitri Pchejetski,
Ryszard Grygorczyk, Johanne Tremblay, Pavel Hamet and Sergei N. Orlov

Journal of Physiology, 2002 Sep 15;543 (Pt 3):835-47

**c-Fos expression in ouabain-treated vascular smooth muscle cells:
from rat aorta: evidence for an intracellular-sodium mediated, calcium-
independent mechanism**

**Sebastien Taurin, Nickolai O. Dulin*, Dimitri Pchejetski,
Ryszard Grygorczyk, Johanne Tremblay, Pavel Hamet and Sergei N. Orlov #**

*Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal – Hôtel-Dieu,
PQ, Canada, and *Department of Medicine, University of Chicago, Chicago, IL,
USA*

Running head: Intracellular Na⁺ and gene expression

Key words: Na⁺_i, Ca²⁺_i, early response genes, transcription factors

#Correspondence and requests for reprints to Dr. Sergei N. Orlov at Centre de recherche,
CHUM - Hôtel-Dieu, 3850 St. Urbain, Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada

Tel: (514) 890-8000 ext 12925; **Fax:** (514) 412-7152

e.mail: [REDACTED]

SUMMARY

In this study, we examined the effect of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump inhibition on the expression of early response genes in vascular smooth muscle cells (VSMC) as possible intermediates of massive RNA synthesis and protection against apoptosis seen in ouabain-treated VSMC in our previous experiments. Incubation of VSMC with ouabain resulted in rapid induction of c-Fos protein expression with an approximately sixfold elevation after 2 h incubation. c-Jun expression was increased by approximately fourfold after 12 h, whereas expression of activating transcription factor 2, cAMP/ Ca^{2+} response element binding protein (CREB)-1 and c-Myc was not altered. Markedly augmented c-Fos expression was also observed under $\text{Na}^+\text{/K}^+$ -pump inhibition in K^+ -depleted medium. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump inhibition triggered c-Fos expression via elevation of the intracellular $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio. This conclusion follows from experiments showing the lack of effect of ouabain on c-Fos expression in high-potassium-low-sodium medium and from the comparison of dose responses of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump activity, $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$ content and c-Fos expression to ouabain. A fourfold increment of c-Fos mRNA was revealed 30 min following addition of ouabain to the incubation medium. At this time point, treatment with ouabain resulted in an approximately to fourfold elevation of $[\text{Na}^+]_i$ but did not affect $[\text{K}^+]_i$. Augmented c-Fos expression was also observed under VSMC depolarization in high-potassium medium. Increment of both c-Fos expression and ^{45}Ca uptake in depolarized VSMC were abolished under inhibition of L-type Ca^{2+} channels with 0.1 μM nifedipine. Ouabain did not affect the free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or the content of exchangeable $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ouabain-induced c-Fos expression was also insensitive to the presence of nifedipine and $[\text{Ca}^{2+}]_o$, as well as chelators of $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (EGTA) and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (BAPTA). The effect of ouabain and serum on c-Fos expression was additive. In contrast to serum, however, ouabain failed to activate Elk-1, serum response factor, CREB and activator protein-1 transcription factors identified within the c-fos promoter. These results suggest that $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump inhibition triggers c-Fos expression via $[\text{Na}^+]_i$ -sensitive $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -independent transcription factor(s) distinct from factors interacting with known response elements of this gene promoter.

INTRODUCTION

In the overwhelming number of eukaryotic cells studied so far, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ is an integral membrane protein responsible for the electrogenic movement of 3Na^+ and 2K^+ against their equilibrium potentials in the overwhelming number of eukaryotic cells studied so far (Therien & Blostien, 2000). The electrochemical gradients of monovalent cations generated by this enzyme are critical for the maintenance of cell volume, resting membrane potential and excitation-contraction coupling as well as the activity of monovalent cation-coupled transporters, including Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange, $\text{Na}^+,\text{K}^+,\text{Cl}^-$ cotransport, cotransport of Na^+ with amino acids, glucose, phosphate and neurotransmitters (Blanco & Merger, 1998). In addition to these fundamental cellular functions, Na^+/K^+ -pump inhibition leads to cell type-specific modulation of cell proliferation and survival. In the majority of cells studied so far, including human prostatic smooth muscle cells, modest inhibition of the Na^+/K^+ -pump accelerates cell growth, whereas its complete inhibition sharply decreases cell survival (Chueh *et al.*, 2001).

The relative contributions of necrosis and apoptosis to cell death under Na^+/K^+ -pump inhibition are still a controversial matter (Contreras *et al.*, 1999; Chueh *et al.*, 2001). It should be emphasized, however, that several cell types, such as monkey kidney epithelial cells (Contreras *et al.*, 1999), rat astrocytes (Murata *et al.*, 1996), and the vascular smooth muscle cells (VSMC) of rabbit (Henningsen *et al.*, 1984) and rat (Orlov *et al.*, 2001), are highly resistant to full-scale inhibition of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-pump}$. Moreover, in rat VSMC (Orlov *et al.*, 1999), rat neuronal cells (Isaev *et al.*, 2000) and porcine renal epithelial cells (Zhou *et al.*, 2001), inhibition of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-pump}$ with ouabain or in potassium-depleted medium protects against apoptosis triggered by diverse stimuli. Using rat VSMC, we also reported that the antiapoptotic effect of ouabain is mediated by elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio (Orlov *et al.*, 1999) and is abolished by inhibitors of protein and RNA synthesis (Orlov *et al.*, 2000b). The latter observation strongly suggests that elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio blocks apoptosis via the expression of inhibitor(s) of the apoptotic machinery.

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and as other monovalent ion transporters involved in adjustment of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio are subjected to regulation by diverse stimuli including endogenous ouabain-like factor, whose circulating level is augmented in several experimental models of hypertension (for recent review, see (Goto & Yamada, 2000)). Keeping these data in mind,

we continued to study the mechanism of suppression of apoptosis under an increased $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio. We found that inhibition of VSMC $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ leads to massive RNA synthesis indicated after 6-12 h by up to 10-fold elevation of $[\text{H}^3]$ -uridine RNA labelling (Orlov *et al.*, 2001). Based on these results, we proposed that inhibition of the VSMC $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump is accompanied by the expression of early responses genes (ERG) (Orlov *et al.*, 2001). This hypothesis is supported by data on ouabain- or low $[\text{K}^+]_o$ -induced expression of mRNA species encoding c-Fos and c-Jun observed in several other cell types, including hepatocytes (Cayanis *et al.*, 1992), fibroblasts, HeLa cells, melanoma cells (Nakagawa *et al.*, 1992), cardiomyocytes (Peng *et al.*, 1996), leukemia THP-cells (Numazawa *et al.*, 1996), lymphocytes (Olej *et al.*, 1998), PC12 (Ando *et al.*, 2000), and mIMCD-3 cells (Joannidis *et al.*, 1997). However, neither RNA synthesis nor ERG expression seems to be a universal property of ouabain-treated cells. Indeed, inhibition of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump diminishes RNA synthesis in *E. coli* (Lubin & Ennis, 1964), sarcoma S-180 cells (Lubin, 1967) and lymphocytes (Szamel & Reshkin, 1981) and does not affect c-Fos expression in Madin Darby canine kidney cells (Joannidis *et al.*, 1997). Moreover, in none of the studies listed here the effect of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump inhibition on the expression of ERG proteins. This last statement is important because of the inhibitory action of elevated $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio on protein synthesis caused by the requirement for high K^+ at a step of amino acid transfer from aminoacyl-RNA to the polypeptide (Lubin & Ennis, 1964).

The role of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -pump as a regulator of ERG expression in VSMC has not yet been explored. Moreover, in spite of well-documented data on ERG mRNA expression in other cell types, several key questions concerning the mechanisms underlying this phenomenon remain unanswered. *First*, the role of modulation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio in ERG expression has not been investigated in the majority of the studies cited here. This issue becomes important because of recent data on the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -independent mechanism of activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in ouabain-treated rat cardiomyocytes (Liu *et al.*, 2000) and canine VSMC (Aydemir-Koksoy & Allen, 2001), and elevation of DNA synthesis in ouabain-treated rat (Golomb *et al.*, 1994) and canine (Aydemir-Koksoy & Allen, 2001) VSMC. *Second*, in studies where an impact of intracellular cations in the regulation of ERG expression has been proposed (Peng *et al.*, 1996), the relative contributions of increased $[\text{Na}^+]_i$ vs reduced $[\text{K}^+]_i$ have not been

explored. *Third*, data on the intracellular signaling systems triggered by Na^+/K^+ -pump inhibition and related to ERG expression are controversial. Thus, for example, c-Fos mRNA expression in ouabain-treated cardiomyocytes was completely blocked by incubation in Calcium-free medium or in the presence of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ chelator BAPTA (Peng *et al.*, 1996), whereas in ouabain-treated fibroblasts, it was independent of the presence of Ca^{2+} and BAPTA (Nakagawa *et al.*, 1992). *Fourth*, transcription factors involved in the regulation of ERG expression by growth factors, Calcium-raising agents and other intermediates of intracellular signaling are well-characterized (Piechaczyk & Blanchard, 1994; Larner & Finbloom, 1995; Whitmarsh & Davis, 1996). The role of these transcription factors in ERG expression triggered by Na^+/K^+ -pump inhibition has not been explored.

In the present study, we report that inhibition of the VSMC Na^+/K^+ -pump with ouabain or in potassium-depleted medium leads to the rapid expression of c-Fos protein. This effect is mediated by $[\text{Na}^+]_i$ elevation rather than $[\text{K}^+]_i$ reduction and is not caused by modulation of cell volume, intracellular pH and Ca^{2+} , or by known transcription factors that interact with c-Fos promoter response elements.

METHODS

Cultured VSMC. VSMC were isolated by explant methods that have been described previously (Orlov et al., 1996), from the aortae of Brietal anesthesia (3 mg kg⁻¹), 10- to 13-week-old male Brown Norway (BN.lx) rats, in accordance with the procedures outlined in the Guide for the Care and Use of Experimental Animals endorsed by the Medical Research Council of Canada. They were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% calf serum, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 µg ml⁻¹ streptomycin for use between 10 and 16 passages. To establish quiescence, the cells were incubated for 48 hr in DMEM containing 0.2% serum.

Na⁺-K⁺-pump activity. Na⁺-K⁺-pump activity was measured as an ouabain-sensitive component of the rate of ⁸⁶Rb influx. VSMC were washed twice with 2 ml aliquots of medium A which contained (mM) NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, D-glucose 5 and Hepes-Tris buffer 20 (pH 7.4). To escape feedback activation of the Na⁺-K⁺-pump by elevation of [Na⁺]_i content (Therrien & Blostien, 2000), the cells were preloaded with Na⁺ by 1 h incubation at 37°C in 1 ml of potassium-depleted medium A. This medium was then aspirated, and 0.25 ml of complete medium A was added with 1 µCi/ml ⁸⁶Rb, 10 µM bumetanide and ouabain at the concentrations shown in Figure 3. In 5 min, isotope uptake was terminated by the addition of 2 ml of ice-cold medium W, which contained (mM) MgCl₂ 100 and Hepes-Tris buffer 10 (pH 7.4). Next, the cells were washed with 4x2-ml aliquots of the same medium and lysed in 1 ml of 1% SDS-4 mM EDTA mixture. The radioactivity of the incubation medium and cell lysate was measured with a liquid scintillation analyzer, and the rate of ⁸⁶Rb influx (V, nmol per mg of protein per 5 min) was calculated as $V = A/am$, where A was the radioactivity of the samples (c.p.m.), a was the specific radioactivity of K⁺ (⁸⁶Rb) in the medium (c.p.m. nmol⁻¹), and m is the protein content.

Intracellular Na⁺ and K⁺ content. The content of exchangeable [Na⁺]_i and [K⁺]_i was measured as the steady-state distribution of extra- and intracellular ²²Na and ⁸⁶Rb, as described previously in detail (Orlov et al., 1999). Briefly, to establish isotope equilibrium, VSMC growing in 12- or 24-well plates were preincubated for 6 h in DMEM containing 0.5 µCi/ml ⁸⁶RbCl or 2 µCi/ml ²²NaCl either with or without ouabain. To study the kinetics

of modulation of $[Na^+]_i$ and $[K^+]_i$ under Na^+ - K^+ -pump inhibition, ouabain was added for the next 5 h. At the end of incubation, the cells were transferred onto ice, washed four times with 2 ml of ice-cold medium W and lysed with SDS/EDTA mixture. The radioactivity of the incubation medium and cell lysate was measured, and intracellular cation content was calculated as A/am , as defined earlier.

Measurement of free $[Ca^{2+}]_i$. VSMC were grown on glass coverslips and incubated for 30-40 min in medium B, which contained 5-10 μ M fura 2-AM. The cells were then washed twice with medium B and kept for up to 30 min at room temperature before the experiments. Two approaches were employed to estimate $[Ca^{2+}]_i$. To measure $[Ca^{2+}]_i$ in the total cell population, the coverslips were mounted in a diagonal position in a 1x1 cm cuvette, and fluorescence was determined under permanent stirring at 37°C (excitation wavelength, λ_{ex} = 340 and 380 nm, slit 4 nm; emission wavelength, λ_{em} = 510 nm, slit 12 nm), using a SPEX FluoroMax spectrofluorimeter (Edison, NJ, USA). Free $[Ca^{2+}]_i$ was quantified as $[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, where K_d is the dissociation constant of the calcium-fura-2 complex (224 nM at 37°C), and $R = F_{340}/F_{380}$ is the ratio of fluorescence at λ_{ex} = 340 and 380 nm. To determine F_{max} , the cells were treated with 0.5 μ M ionomycin in the presence of 1 mM $CaCl_2$. To determine F_{min} , $MnCl_2$ was added at a final concentration of 2 mM. To measure $[Ca^{2+}]_i$ in single cells by fluorescence ratio imaging, coverslips were placed in the bottom of a laminar flow-through chamber mounted on the stage of a Nikon inverted microscope equipped for epifluorescence (Eclipse TE300, Nikon, Tokyo, Japan). Fura 2-loaded cells were illuminated at 340 and 380 nm, with a 100 W mercury lamp and interference filters (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT) mounted on a filter wheel (Sutter Lambda 10-C, Sutter Instruments, MA) and a dichroic mirror (510/40 nm, Chroma Technology Corp.). Images obtained at λ_{em} = 510 nm were acquired via a 40x objective (CFI PL FLUOR, Nikon) and a Princeton T57 Micromax CCD camera at the rate of 1 ratio image per 4 s. In this imaging system (Canabra Packard Canada, Mississauga, ON), cell illumination and fluorescence image acquisition hardware were run by MetaFluor software (Universal Imaging, West Chester, PA, USA).

Ca^{2+} uptake and exchangeable $[Ca^{2+}]_i$ content were measured in accordance with a previously described method (Orlov *et al.* 1996). Briefly, quiescent VSMC seeded in 24 well plates were preincubated for 30 min in medium B. Then, the medium was aspirated,

and 0.25 ml of medium B containing 0.2 mM CaCl_2 was added. After 5 min of incubation at 37 °C, 0.256 ml of low-potassium medium (5 mM KCl, 145 mM NaCl) or high-potassium medium (120 mM KCl, 30 mM NaCl) containing 2-3 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ $^{45}\text{CaCl}_2$ with or without 0.2 mM nifedipine was added. Isotope uptake was terminated in 5 min, radioactivity within the cells was counted, and Ca^{2+} uptake was calculated as indicated earlier. To measure the content of exchangeable $[\text{Ca}^{2+}]_i$, the cells were incubated for 6 h in DMEM containing 1-2 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ $^{45}\text{CaCl}_2$ with or without ouabain.

Intracellular pH measurement. VSMC growing in 85 cm^2 flasks were harvested in DMEM containing 0.05 % trypsin and 0.1 % EDTA, washed once with DMEM containing 10 % calf serum and twice with medium B containing 0.1 % bovine serum albumin (BSA). They were then incubated for 30 min at room temperature in 3 ml of the same medium containing 10 μM 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM). The cells were subsequently washed twice with medium B containing 0.1 % BSA and kept in 1 ml of the same medium at 37 °C with or without 1 mM ouabain. After 1 h, 0.2 ml of the cell suspension was added to 2.5 ml of medium B with or without 1 mM ouabain, and BCECF fluorescence was measured with a SPEX FluoroMax spectrofluorimeter at λ_{ex} 495 and 440 nm, slit 5 nm and λ_{em} 530 nm, slit = 12 nm. Fluorescence was calibrated in terms of intracellular pH (pH_i) in sodium-free medium containing 10 μM nigericin. In these experiments, we observed that elevation of extracellular pH from 6.71 to 7.75 by addition of aliquots of 1 M Tris augmented the F_{495}/F_{440} ratio from 5.1 to 9.5. We have employed this method previously in a study of the $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger in VSMC (Orlov *et al.* 2000a).

Cell volume measurement. [^{14}C]urea equilibrium distribution was used to measure intracellular water space. Cells seeded in 12 well plates were incubated for 6 h in DMEM containing 2 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ [^{14}C]urea and then aliquots of medium were added with the same radioactivity with or without ouabain at a final concentration of 1 mM. To induce hyperosmotic shrinkage, mannitol was added to DMEM at a final concentration of 100 or 300 mM. After termination of the experiments, the cells were washed with 4x3 ml of ice-cold medium W and lysed for radioactivity measurement as described above. The volume of intracellular water (V_i , $\mu\text{l (mg protein)}^{-1}$) was calculated as $V_i = V_o A_i / A_o m$, where A_i and A_o are the radioactivity of [^{14}C]urea in the cell lysate and incubation medium, respectively

(d.p.m.), m is the protein content in the cell lysate (mg), and V_0 is the volume of the incubation medium (μ l) used for A_0 determination.

Western blotting. VSMC grown in 75 cm² flasks and treated as indicated in the figure captions were scraped with a rubber policeman, washed with ice-cold medium C, which contained 150 mM NaCl and 10 mM Hepes-Tris (pH 7.4), and centrifuged (500 g, 5 min). The resultant cell pellet was washed twice with the same medium and lysed with buffer containing 150 mM NaCl, 25 mM Hepes-Tris (pH 7.5), 0.1 % SDS, 0.25 % sodium deoxycholate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 200 μ M phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 μ g ml⁻¹ leupeptin and 1 μ g ml⁻¹ aprotinin. Equal portions of cell lysate (20 μ g lane⁻¹) were electrophoresed on a 10 % SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane, washed with phosphate-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 (PBS-Tween) and 0.5 % skimmed milk, and incubated overnight at 4 °C with ERG antibodies. After incubation, the membranes were washed three times with PBS-Tween and incubated for 1 h with horseradish-peroxidase-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The membranes were then washed with PBS-Tween and the protein bands were visualized with an enhanced chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology) and exposed to X-ray film. Relative protein content was determined using the NIH Image program.

Northern blotting. VSMC were collected as described earlier, and total RNA was isolated with TRIZOL reagent (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) in accordance with the manufacturer's instructions. Total RNA (10 μ g), as determined by UV spectrophotometry, was subjected to gel electrophoresis, transferred to a Hybond N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada), UV immobilized and hybridized to ³²P-labelled probes. c-Fos mRNA forward (AGGAATAAGATGGCTGCAGCCAAG) and reverse (GACTCTGGGGTGGTAGCCTCAG) primers corresponding to the 569-838 region of rat c-Fos mRNA were synthesized using the primer-designed GeneFisher program. GAPDH forward (ATGGTGAAGGTCGGTGTCAACGCA) and reverse (GAGCCCTTCCACGATGCCAAAGTTGTCATG) primers were provided by Dr Y. Sun (CHUM, Université de Montréal). The probes were purified with the Wizard PCR Preps DNA purification system from Promega (Madison, WI, USA), and quantified with the Low DNA Mass Ladder (Life Technologies).

They were labelled with a Random primer DNA labelling system kit (Life Technologies), purified on Sephadex G-50, hybridized for 24 h, visualized on the Phosphor-Imager (Molecular Dynamics, CA, USA) and quantified with ImageQuant version 5.1 software (Molecular Dynamics). Ribosomal S18 RNA was visualized on the membrane by fluorescence in a Typhoon 8600 (Molecular Dynamics).

Activity of transcription factors. Activation of the transcription factors Elk-1 and adenosine cAMP/Ca²⁺ response element binding protein (CREB) was measured by the 'PathDetect' transreporter system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Briefly, fusion transactivator plasmids encoding the GAL4 DNA-binding domain and the activation domains of Elk-1 or CREB, respectively, were co-transfected with the plasmid encoding the luciferase gene under the control of GAL4-binding elements. Agonist-induced activation of Elk-1 or CREB results in binding of the corresponding fusion transactivator to GAL4-binding elements and activation of transcription of the luciferase gene. VSMC at 90 % confluency grown on 24 well plates were transfected with the following plasmids (per well): 200 ng pFR-luciferase (luciferase reporter plasmid), 10 ng pFA2-Elk-1 or 10 ng pFA2-CREB (fusion transactivator plasmids), and 200 ng pcDNA3-LacZ (transfection efficiency control plasmid). The day before stimulation, the cells were serum-starved overnight in 0.2 % calf serum, followed by incubation for 6 h with 1 mM ouabain or 10 % serum. They were then washed twice with PBS, lysed in protein extraction reagent, and the cleared lysates were assayed for luciferase and β -galactosidase activity with corresponding assay kits (Promega, Madison, WI, USA). To account for the differences in transfection efficiency, the luciferase activity of each sample was normalized to that of β -galactosidase activity. Serum response factor (SRF) activity was measured by cis-reporter assay using the luciferase reporter plasmid for the mutant serum response element (SRE) of the c-Fos promoter lacking the T-cell-factor binding site (Hill *et al.* 1995). The activity of activator protein (AP)-1 was also measured by cis-reporter assay, using the AP1-luciferase reporter plasmid (Stratagene). VSMC were transfected with 100 ng luciferase cis-reporter plasmids and 200 ng pcDNA3-LacZ, then stimulated with ouabain or control agonists, followed by luciferase assay, as described earlier.

Chemicals. [¹⁴C]Urea, ⁸⁶RbCl, ²²NaCl and ⁴⁵CaCl₂ were obtained from Amersham (Montreal, QC, Canada); furosemide, bumetanide, ouabain, nifedipine, monensin,

nigericin and valinomycin were from Sigma (Oakville, ON); fura-2 AM and BCECF AM were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA); BAPTA AM was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Polyclonal antibodies for c-Fos, c-Jun, c-Myc, CREB-1 and activating transcription factor (ATF)-2 were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Salts and buffers were purchased from Sigma and Anachemia Science (Montreal, QC, Canada).

RESULTS

Na⁺-K⁺ pump inhibition causes rapid c-Fos expression in VSMC

Incubation of VSMC with ouabain resulted in rapid induction of c-Fos protein expression, levels increasing by approximately sixfold after 2 h incubation, followed by a decline to the basal level by 24 h (figure 1). In contrast to c-Fos, ouabain-induced c-Jun expression reached the maximum of approximately fourfold induction at 12 h, a level that was sustained for up to 24 h (figure 1). We failed to observe any effect of ouabain on the expression of ATF-2, CREB or c-Myc (figure 1A). We focused our further studies on the mechanism of induction of c-Fos expression in ouabain-treated cells.

The affinity of the ubiquitous $\alpha 1$ isoform of the Na⁺-K⁺ pump for cardiac glycosides in rodents is three- to fourfold lower than in other mammalian species, and 1 mM ouabain should be added to inhibit this enzyme in rat VSMC by 80-90 % (Willis & Ellory, 1983). Keeping in mind the possibility of ouabain side-effects at high concentrations, we used potassium-free medium as an alternative approach for Na⁺-K⁺ pump inhibition. Figure 2 shows that similarly to ouabain, 6 h incubation of VSMC in potassium-depleted medium sharply augmented c-Fos expression.

Ouabain triggers c-Fos expression via elevation of the intracellular [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio

The electrogenic Na⁺-K⁺ pump can affect c-Fos expression by modulation of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio as well as by rapid depolarization of VSMC or activation of the distinct signaling cascade triggered by its conformational transition. To examine these possibilities, we compared the dose-responses of Na⁺-K⁺ pump activity, the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio and c-Fos expression to the increasing ouabain concentrations.

The addition of 100 μ M ouabain led to an approximately twofold inhibition of the rate of K⁺ (⁸⁶Rb) influx in sodium-loaded VSMC (used as a measure of maximal Na⁺-K⁺ pump activity; (Figure 3A, curve 1). However, because of feedback activation of the Na⁺-K⁺ pump by intracellular Na⁺ (Therien & Blostien, 2000), the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio still remained at the basal level under treatment with 100 μ M ouabain, and increment of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio became evident at 500 μ M and higher concentrations of ouabain (figure 3A, curves 2 and 3). The lack of effect on ⁸⁶Rb uptake of ouabain at concentrations less

than 10 μM suggests a major contribution of the low affinity $\alpha 1$ isoform of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump in regulation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio. This conclusion is in accordance with the lack of expression of mRNA encoding the $\alpha 2$ and $\alpha 3$ isoforms of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump with high affinity for ouabain in cultured VSMC from the rat aorta (Yamamoto *et al.* 1994), low expression of $\alpha 2$ and $\alpha 3$ proteins in freshly isolated rat arteries and in VSMC compared to neuronal cells (Sahin-Erdemli *et al.* 1994) and immunocytochemical data showing expression of these isoforms in the restricted plasma membrane area termed the plasmersome (Juhsova & Blaustein, 1997; Blaustein & Lederer, 1999).

There was no significant effect of 100 μM ouabain on c-Fos expression, whereas at 500 and 1,000 μM , immunoreactive c-Fos protein content was increased by fourfold and sevenfold, respectively (figure 3B and C). These results show that elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio is an obligatory intermediate for the triggering of c-Fos expression by ouabain.

c-Fos expression in ouabain-treated VSMC is mediated by elevation of $[\text{Na}^+]_i$

The 2 h incubation of VSMC with ouabain was sufficient to increase immunoreactive c-Fos content by five- to eightfold (figure 1B). At this time point, ouabain led to an elevation of exchangeable $[\text{Na}^+]_i$ content of approximately 15-fold, whereas $[\text{K}^+]_i$ content was decreased by only 40-50 % (figure 4A). To further examine the relative contributions of $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$ in c-Fos expression, we employed Northern blot analysis of c-Fos mRNA content. In these experiments, sustained elevation of c-Fos mRNA content was observed in following treatment with ouabain for 10 min, with an increment of up to fourfold in 30 min (i.e. at time points when there was no significant effect of ouabain on $[\text{K}^+]_i$ content), whereas $[\text{Na}^+]_i$ was increased by approximately fourfold (figure 4A). These kinetics show that elevation of $[\text{Na}^+]_i$ rather than attenuation of $[\text{K}^+]_i$ content is a key intermediate of c-Fos expression in VSMC with an inhibited $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump.

Role of cell volume, intracellular pH and Ca^{2+}

Elevation of $[\text{Na}^+]_i$ can affect $[\text{pH}]_i$ and free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by activation of the $\text{Na}^+\text{-H}^+$ and $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger, respectively. In addition, an increased $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio can alter the total content of intracellular osmolytes, thus affecting VSMC

volume. To examine the relative contribution of pH_i , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and cell volume in c-Fos expression triggered by elevated $[\text{Na}^+]_i$, we studied their modulation by ouabain.

We did not detect any pH_i changes in VSMC treated with 1 mM ouabain for 1 h ($\text{pH}_i = 7.11 \pm 0.14$ vs. 7.09 ± 0.12 in control and ouabain-treated cells, respectively, $n = 4$). These results are in accordance with the prevalence of the Na^+-Na^+ mode of operation of the Na^+-H^+ exchanger shown with cultured BCECF-loaded VSMC in our recent study (Orlov *et al.* 2000a). In contrast to unaltered pH_i , VSMC volume was decreased from 2.49 ± 0.12 to 2.09 ± 0.14 μl of cell water per mg of protein after 2 h of ouabain exposure (figure 5A). A similar reduction of cell volume was observed in the presence of 100 mM mannitol, whereas at 300 mM, this impermeable osmolyte decreased VSMC volume by ~35-40 % (figure 5B). Previously, it was found that cell shrinkage leads to the expression of several mRNA species (Burg, 1995), including $\alpha 1$ and $\beta 1$ $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ subunits (Muto *et al.* 1998). However, mannitol failed to affect basal (figure 5C) or ouabain-induced (data not shown) c-Fos expression in VSMC. These results rule out the role of pH_i and cell volume as intermediates of c-Fos expression in ouabain-treated VSMC.

The electrogenic Na^+-K^+ pump can also affect c-Fos expression by rapid depolarization of VSMC. In various types of electrically excitable cells, including VSMC (Orlov *et al.* 1996), elevation of $[\text{K}^+]_o$ causes cell depolarization and activation of L-type Ca^{2+} channels. In our experiments, incubation of VSMC in a high-potassium medium led to a similar activation of c-Fos expression as observed in ouabain-treated cells (figure 6). However, the following results indicate that this effect does not represent the mechanism for ouabain-induced c-Fos expression, but is rather mediated by a distinct, calcium-dependent pathway. Indeed, incubation of VSMC in a high-potassium medium augmented ^{45}Ca uptake from 327 ± 33 to 831 ± 52 $\text{pmol} (\text{mg protein})^{-1} (5 \text{ min})^{-1}$, an effect that was completely blocked by nifedipine ($0.1 \mu\text{M}$), an inhibitor of L-type Ca^{2+} channels. Similarly to Ca^{2+} uptake, an increment of c-Fos expression triggered by a high-potassium medium was also abolished by nifedipine (figure 6). By contrast, the effect of ouabain on c-Fos expression was not affected by nifedipine, which rules out a role for L-type Ca^{2+} channels in ouabain-induced c-Fos expression.

As $[\text{Ca}^{2+}]_i$ can be a potent trigger of c-Fos expression, we further investigated its potential involvement in ouabain-induced expression of c-Fos in VSMC. However, the

following results do not support this possibility. First, we measured $[Ca^{2+}]_i$ in the total population of fura-2-loaded cells. We did not observe any significant effect of 1 mM ouabain on $[Ca^{2+}]_i$ or on the Ca^{2+} signal triggered by thapsigargin, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump (figure 7A and C). Second, we measured the F_{340}/F_{380} ratio in single fura-2-loaded cells by fluorescence microscopy. We failed to find any systematic effect of ouabain on this parameter (figure 7B and D). Third, we measured the total content of exchangeable $[Ca^{2+}]_i$. After incubation of VSMC with ouabain for 6 h, the steady-state content of ^{45}Ca in VSMC was slightly decreased rather than increased (figure 7E). Fourth, we examined the influence of $[Ca^{2+}]_o$ on c-Fos expression in ouabain-treated cells. Figure 8 shows that the effect of ouabain on c-Fos expression was not dependent on the presence of $CaCl_2$ in the incubation medium. Fifth, to maintain $[Ca^{2+}]_i$ in the incubation medium at a level less than 0.1 μM , we added 0.1 mM EGTA. Neither EGTA nor the $[Ca^{2+}]_i$ chelator BAPTA affected c-Fos expression in ouabain-treated VSMC (figure 8). Taken together, these data rule out a role for $[Ca^{2+}]_i$ in ouabain-induced c-Fos expression.

Additive affect of ouabain and serum on c-Fos expression

The data described above were obtained on quiescent VSMC. Does inhibition of the Na^+-K^+ pump affect c-Fos expression in the presence of serum-derived growth factors? Figure 9A shows that the addition of serum to quiescent VSMC led to the same sharp and transient pattern of c-Fos mRNA expression as was observed with ouabain-treated cells (figure 4B), which complicates quantification of their combined action. In contrast to c-Fos mRNA expression, ouabain-induced c-Fos protein content stayed elevated and did not significantly decrease when incubated with the drug for between 2 and 12 h (figure 1), whereas it was sharply diminished within 6 h in serum-supplied cells (figure 9B). Using this time point, we observed that ouabain augmented c-Fos expression by approximately twofold in the presence of serum (figure 10), suggesting that the effects of ouabain and serum are additive.

Role of known c-Fos transcription factors

The additive effect of serum and ouabain on c-Fos expression suggests that these stimuli employ distinct transcription factors and/or distinct response elements of the c-Fos

promoter. To examine this hypothesis, we studied the impact of ouabain on the activity of transcription factors known to regulate the c-Fos promoter. The c-Fos promoter contains three major transcriptional control elements: SRE interacting with ternary complex factors, such as Elk-1, and with SRF, cAMP/Ca²⁺ response element (CRE) interacting with CREB, and AP-1 interacting with the c-Fos-c-Jun complex to provide feedback regulation of c-Fos expression (Wang & Howells, 1994). The c-Fos-c-Jun complex becomes active under phosphorylation of c-Fos and c-Jun by extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and jun-kinase (JNK), respectively (Piechaczyk & Blanchard, 1994; Whitmarsh & Davis, 1996). Previously, we did not observe any activation of ERK1/2, JNK and p38 MAPK in ouabain-treated VSMC (Orlov *et al.* 2000*b*). In the present study, we examined the effect of ouabain on the activity of Elk-1, SRF, CREB and AP-1 transcription factors, using corresponding luciferase reporter assays. As shown in table I, the activity of these transcription factors was augmented by serum, which was used as a positive control. In contrast, ouabain did not affect the activity of Elk-1 or CREB, and even suppressed the basal expression of luciferase driven by SRF and AP-1.

DISCUSSION

Our results show that inhibition of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump in VSMC with ouabain or potassium-depleted medium leads to massive c-Fos protein expression (figure 1 and 2), which is consistent with the transient c-Fos mRNA expression observed in several other cell types (Cayanis *et al.* 1992; Nakagawa *et al.* 1992; Numazawa *et al.* 1996; Peng *et al.* 1996; Joannidis *et al.* 1997; Olej *et al.* 1998; Ando *et al.* 2000). In VSMC, the addition of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ of actinomycin D completely blocked RNA synthesis (Orlov *et al.* 2000b). This inhibitor of RNA synthesis also blocked an increment in c-Fos production in ouabain-treated VSMC (data not shown), revealing that $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump inhibition elicits an increased rate of c-Fos RNA synthesis rather than a decreased rate of its degradation. By comparing the dose-dependencies of the effect of ouabain on $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump activity and $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$ content (figure 3), we demonstrated that induction of c-Fos expression is mediated by elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio rather than by $[\text{Na}^+]_i$ - $[\text{K}^+]_i$ -independent systems triggered by the inactivated $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump, which has been studied in more detail in rat cardiomyocytes (Kometiani *et al.* 1998). Most importantly, we report here for the first time that: (1) c-Fos expression is triggered by elevation of $[\text{Na}^+]_i$ rather than by decrease of $[\text{K}^+]_i$; (2) c-Fos expression in VSMC can also be triggered by elevated Ca^{2+} influx in depolarized cells (although the calcium-dependent pathway is not involved in the c-Fos expression triggered by $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump inhibition); (3) the $[\text{Na}^+]_i$ -sensitive, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -independent mechanism of c-Fos expression is not mediated by the activation of transcriptional factors coupled to the known response elements of its gene promoter.

Data on the relative contributions of $[\text{Na}^+]_i$ vs. $[\text{K}^+]_i$ in the regulation of gene expression are limited to a few publications. Thus, Ruiz-Opazo and co-workers (1997) reported augmented $\alpha 1\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ mRNA expression after treatment of A10 cells with monensin, an ionophore that provides electroneutral $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange. Augmented $\alpha 1\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ mRNA expression was also observed in monensin-treated renal epithelial cells (Muto *et al.* 2000). It should be emphasized, however, that a key role of elevated $[\text{Na}^+]_i$ proposed in these studies was not supported by comparative analysis of the effect of these compounds on $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$ content. This comment becomes important because in our experiments, the 6 h exposure of VSMC to $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ monensin led to non-

selective elevations of $[Na^+]_i$ and $[K^+]_i$ by ~35 % and 80 %, respectively. Exposure of VSMC to valinomycin for 6 h provided selective transmembrane K^+ movement, did not affect $[Na^+]_i$, but decreased $[K^+]_i$ by twofold. Neither monensin nor valinomycin affected c-Fos expression in VSMC (data not shown). Keeping in mind these negative results and non-selective and/or modest effects of these compounds on $[Na^+]_i$ and $[K^+]_i$ content, we focused on the kinetics of ouabain-induced modulation of $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$ and c-Fos mRNA expression. Because the resting membrane potential of VSMC ($E_m \sim -50$ mV) is closer to E_K than to E_{Na} (~ -100 mV and $+80$ mV, respectively; Davis *et al.* 1997), inhibition of the Na^+-K^+ pump during the initial 1 h sharply augmented $[Na^+]_i$, but did not significantly affect $[K^+]_i$ (figure 4). Maximal increment of c-Fos mRNA production was found within 30 min of ouabain addition, which allowed us to conclude that Na^+-K^+ pump inhibition triggers c-Fos expression via $[Na^+]_i$ elevation.

Growth factors, peptide hormones and neurotransmitters affect c-Fos expression via activation of transcription factors by various protein kinases such as MAPK, protein kinase A and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase (for review, see Piechaczyk & Blanchard, 1994; Sheng *et al.* 1998; Whitmarsh & Davis, 2000).

Data obtained in the present study show that the calcium-dependent pathway of c-Fos expression can be triggered by activation of L-type Ca^{2+} channels during sustained depolarization of VSMC in high-potassium medium (figure 6). This observation is consistent with the calcium-dependent excitation-transcription coupling seen in other electrically excitable cells (for review, see Anderson, 2000). However, in contrast to depolarized cells, we did not detect any effect of ouabain on $[Ca^{2+}]_i$ handling (figure 7). Ouabain-induced c-Fos expression was not affected by the blockade of L-type Ca^{2+} channels (figure 6), or by the chelation of $[Ca^{2+}]_o$ and $[Ca^{2+}]_i$ (figure 8). These results contradict data showing that chelation of $[Ca^{2+}]_o$ and $[Ca^{2+}]_i$ results in the inhibition of ouabain-induced c-Fos expression in cardiomyocytes (Peng *et al.* 1996). It should be emphasized, however, that cardiomyocytes are rich in Na^+-Ca^{2+} exchanger, and $[Na^+]_i$ elevation in these cells sharply activates ^{45}Ca influx (Blaustein & Lederer, 1999). Several research teams have reported that application of ouabain transiently increases $[Ca^{2+}]_i$ in freshly isolated aortic strips and primary cultured VSMC (for review, see Blaustein & Lederer, 1999). In our cells, which were subjected to more than 10 passages, we failed to

observe any effect of ouabain on ^{45}Ca uptake (Orlov *et al.* 1993) or on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 7A-D) and exchangeable $[\text{Ca}^{2+}]_i$ content (figure 7E). Regardless of the mechanism of downregulation of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger in VSMC used in our study, it is important to stress that this phenomenon allowed us to dissect calcium-dependent and sodium-dependent mechanisms of c-Fos expression revealed in cells subjected to depolarization in K^+ -free

Previously, we did not detect MAPK activation in ouabain-treated VSMC (Orlov *et al.* 2000b). Viewed collectively with these studies, our present results suggest that neither calcium-dependent kinases nor downstream steps of MAPK signalling contribute to activation of the c-Fos promoter in ouabain-treated VSMC. To test this hypothesis and to assess the involvement of other known mechanisms of c-Fos induction, we examined the role of SRE, CRE and AP-1, the established regulatory elements of the c-Fos promoter, in $[\text{Na}^+]_i$ -dependent c-Fos expression. Our data, summarized in table I, show that none of these regulatory elements is involved in triggering ouabain-induced c-Fos expression, suggesting the existence of other elements in the c-Fos promoter that interact with transcription factor(s) distinct from Elk-1, SRF, CREB and AP1. The recently discovered intragenic regulation of c-Fos expression via suppression of a transcriptional pause site, located at intron 1 of the c-Fos gene (Coulon *et al.* 1999), is in accordance with this notion. Such a possibility will be addressed in future studies.

In conclusion, our results show that inhibition of the Na^+ - K^+ pump triggers c-Fos expression by a $[\text{Na}^+]_i$ -sensitive, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -independent mechanism, without the recruitment of transcription factors known to stimulate the c-Fos promoter. This raises at least two questions: What is the molecular origin of the $[\text{Na}^+]_i$ sensor that triggers the initial signal? Which systems are involved in downstream signal transduction and activation of the c-Fos promoter? We will address these questions in forthcoming experiments.

Acknowledgements: This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-10803) and the Heart and Stroke Foundation of Canada. The technical assistance of Monique Poirier and the editorial help of Ovid Da Silva are appreciated.

REFERENCE LIST

- Anderson, M. E. (2000). Connections count. Excitation-contraction meets excitation-transcription coupling. *Circulation Research* **86**, 717-719.
- Ando, K., Omi, N., Shimosawa, T., Takanashi, K., & Fujita, T. (2000). Effect of ouabain on the growth and DNA synthesis of PC12 cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **37**, 233-238.
- Aydemir-Koksoy, A. & Allen, J. C. (2001). Low concentrations of ouabain induce vascular smooth muscle proliferation. *Cellular and Molecular Biology* **47**, 341-345.
- Blanco, G. & Merger, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology* **275**, F663-F650.
- Blaustein, M. P. & Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews* **79**, 763-854.
- Burg, M. B. (1995). Molecular basis of osmotic regulation. *American Journal of Physiology* **268**, F983-F996.
- Cayanis, E., Russo, J. J., Wu, Y., & Edelman, I. S. (1992). Serum independence of low K⁺ induction of Na-K-ATPase: possible role of c-fos. *Journal of Membrane Biology* **125**, 163-170.
- Chueh, S.-C., Guh, J.-H., Chen, J., Lai, M.-K., & Teng, C.-M. (2001). Dual effect of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. *Journal of Urology* **166**, 347-353.

Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lazaro, A., & Cereijido, M. (1999). Relationship between Na^+, K^+ -ATPase and cell attachment. *Journal of Cell Science* **112**, 4223-4232.

Coulon, V., Veyrone, J.-L., Tourkine, N., Vié, A., Hipskind, R. A., & Blanchard, J.-M. (1999). A novel calcium signaling pathway targets the *c-fos* intragenic transcriptional pausing site. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 30439-30446.

Davis, J. P., Harper, A. A., & Chipperfield, A. R. (1997). Stimulation of intracellular chloride accumulation by noradrenaline and hence potentiation of its depolarization of rat arterial smooth muscle in vitro. *British Journal of Pharmacology* **122**, 639-642.

Golomb, E., Hill, M. R., Brown, R. B., & Keiser, H. R. (1994). Ouabain enhanced the mitogenic effect of serum in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Hypertension* **7**, 69-74.

Goto, A. & Yamada, K. (2000). Putative roles of ouabain-like compound in hypertension: revised. *Hypertension Research* **23**, 7-13.

Henningsen, N., Stavenow, L., & Borg, C. (1984). Effect of ouabain and potassium on rabbit arterial smooth muscle cells in culture. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **44**, 197-201.

Hill, C. S., Wynne, J., & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159-1170.

Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., Halle, A., Harms, C., Lautenschlager, M., Weih, M., Dirnagl, U., Victorov, I. V., & Zorov, D. B. (2000). Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity in cultured cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neuroscience Letters* **283**, 41-44.

Joannidis, M., Cantley, L. G., Spokes, K., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L., & Epstein, F. H. (1997). Modulation of c-fos and egr-1 expression in the isolated perfused kidney by agents that alter tubular work. *Kidney International* **52**, 130-139.

Juhasova, M. & Blaustein, M. P. (1997). Na⁺ pump low and high ouabain affinity α subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* **94**, 1800-1805.

Kometiani, P., Li, J., Gnudi, L., Kahn, B. B., Askari, A., & Xie, Z. (1998). Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: the roles of ras and mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 15249-15256.

Larner, A. C. & Finbloom, D. S. (1995). Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism which regulates cytokine activation of early response genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1266**, 278-287.

Liu, J., Tian, J., Haas, M., Shapiro, J. I., Askari, A., & Xie, Z. (2000). Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascade independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 27838-27844.

Lubin, M. (1967). Intracellular potassium and macromolecular synthesis in mammalian cells. *Nature* **213**, 451-453.

Lubin, M. & Ennis, H. L. (1964). On the role of intracellular potassium in protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **80**, 614-631.

Murata, Y., Matsuda, T., Tamada, K., Hosoi, R., Asano, S., Takuma, K., Tanaka, K., & Baba, A. (1996). Ouabain-induced cell proliferation in cultured rat astrocytes. *Japanese Journal of Pharmacology* **72**, 347-353.

Muto, S., Nemoto, J., Okada, K., Miyata, Y., Kawakami, K., Saito, T., & Asano, Y. (2000). Intracellular Na^+ directly modulates Na^+, K^+ -ATPase gene expression in normal rat kidney epithelial cells. *Kidney International* **57**, 1617-1653.

Muto, S., Ohtaka, A., Nemoto, J., Kawakami, K., & Asano, Y. (1998). Effect of hyperosmolality on Na, K -ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Journal of Membrane Biology* **162**, 233-245.

Nakagawa, Y., Rivera, V., & Larner, A. C. (1992). A role for Na/K -ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 8785-8788.

Numazawa, S., Inoru, N., Nakuta, H., Sugiyama, T., Fijino, E., Shinoki, M., Yoshida, T., & Kuroiwa, Y. (1996). A cardiac steroid bufalin-induced differentiation of THP- cells. Involvement of Na^+, K^+ -ATPase inhibition in the early changes on proto-oncogene expression. *Biochemical Pharmacology* **52**, 321-329.

Olej, B., dos Santos, N. F., Leal, L., & Rumjanek, V. M. (1998). Ouabain induces apoptosis in PHA-activated lymphocytes. *Bioscience Report* **18**, 1-7.

Orlov, S. N., Adarichev, V. A., Devlin, A. M., Maximova, N. V., Sun, Y.-L., Tremblay, J., Dominiczak, A. F., Postnov, Y. V., & Hamet, P. (2000a). Increased Na^+/H^+ exchanger isoform 1 activity in spontaneously hypertensive rats: lack of mutations within coding region of NHE1. *Biochimica et Biophysica Acta* **1500**, 169-180.

Orlov, S. N., Resink, T. J., Bernhardt, J., Ferracin, F., & Buhler, F. R. (1993). Vascular smooth muscle cell calcium transport. Regulation by angiotensin II and lipoproteins. *Hypertension* **21**, 195-203.

Orlov, S. N., Taurin, S., Thorin-Trescases, N., Dulin, N. O., Tremblay, J., & Hamet, P. (2000b). Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle cells by induction of RNA synthesis. *Hypertension* **35**, 1062-1068.

Orlov, S. N., Taurin, S., Tremblay, J., & Hamet, P. (2001). Inhibition of Na^+/K^+ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio: possible implication in vascular remodeling. *Journal of Hypertension* **19**, 1559-1565.

Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S. V., Tremblay, J., & Hamet, P. (1999). Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 16545-16552.

Orlov, S. N., Tremblay, J., & Hamet, P. (1996). cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **27**, 774-780.

Peng, M., Huang, L., Xie, Z., Huang, W.-H., & Askari, A. (1996). Partial inhibition of Na^+/K^+ -ATPase by ouabain induces the Ca^{2+} -dependent expression of early-response genes in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 10372-10378.

Piechaczyk, M. & Blanchard, J. M. (1994). c-fos proto-oncogene regulation and function. *Critical Reviews in Oncology & Hematology* **17**, 93-131.

Ruiz-Opazo, N., Cloix, J.-F., Melis, M.-G., Xiang, X. H., & Herrera, V. L. M. (1997). Characterization of a sodium-response transcriptional mechanism. *Hypertension* **30**, 191-198.

Sahin-Erdemli, I., Rashed, S. M., & Songu-Mize, E. (1994). Rat vascular tissues express all three α -isoforms of Na^+/K^+ -ATPase. *American Journal of Physiology* **266**, H350-H353.

Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G., & Greenberg, M. E. (1998). Calcium and growth factor pathways of c-Fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Molecular and Cell Biology* **8**, 2787-2796.

Szamel, M. & Reshkin, S. J. (1981). Inhibition of lymphocyte activation by ouabain. Interference with the early activation of membrane phospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* **647**, 297-301.

Therien, A. G. & Blostien, R. (2000). Mechanisms of sodium pump regulation. *American Journal of Physiology* **279**, C541-C566.

Wang, W. W. & Howells, R. D. (1994). Sequence of the 5'-flanking region of the rat s-foc protooncogene. *Gene* **143**, 261-264.

Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of Molecular Medicine* **74**, 589-607.

Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription function by phosphorylation. *Cellular & Molecular Life Sciences* **57**, 1172-1183.

Willis, J. S. & Ellory, J. C. (1983) Ouabain-sensitivity: diversities and disparities. In: Current Topics in Membranes and Transport vol. 19 Hoffman, J. F. and Forbush III, B. eds. New York, Academic Press. pp.227-280.

Yamamoto, K., Ikeda, U., Saito, T., Kawakami, K., & Shimada, K. (1994). Sodium ion mediated regulation of Na/K-ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research* **28**, 957-962.

Zhou, X., Jiang, G., Zhao, A., Bondeva, T., Hirzel, P., & Balla, T. (2001). Inhibition of Na,K-ATPase activates PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-PK1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **285**, 46-51.

Figure 1 : Effect of ouabain on early response gene (ERG) expression in quiescent vascular smooth muscle cells (VSMC)

A, representative blot showing expression of c-Fos, c-Jun, activating transcription factor (ATF)-2 and cAMP-Ca²⁺ response element binding protein (CREB)-1 proteins after incubation of VSMC for up to 24 h with 1 mM ouabain. **B**, kinetics of c-Fos (●) and c-Jun (○) expression in ouabain-treated quiescent VSMC. ERG content in the absence of ouabain was taken as 1.0. Means ± S.E.M. from three experiments are shown.

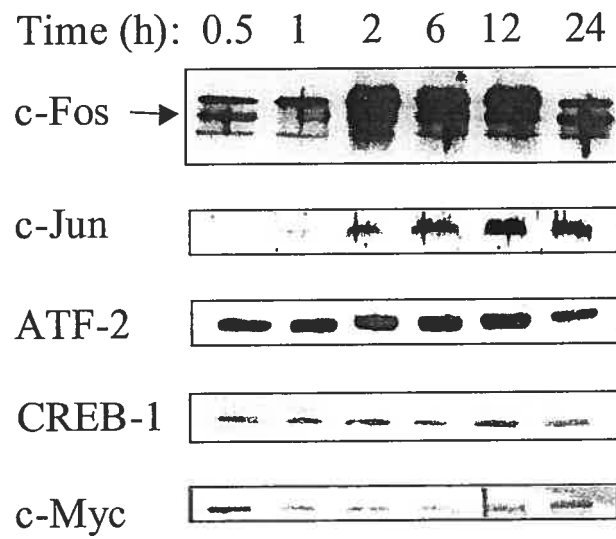
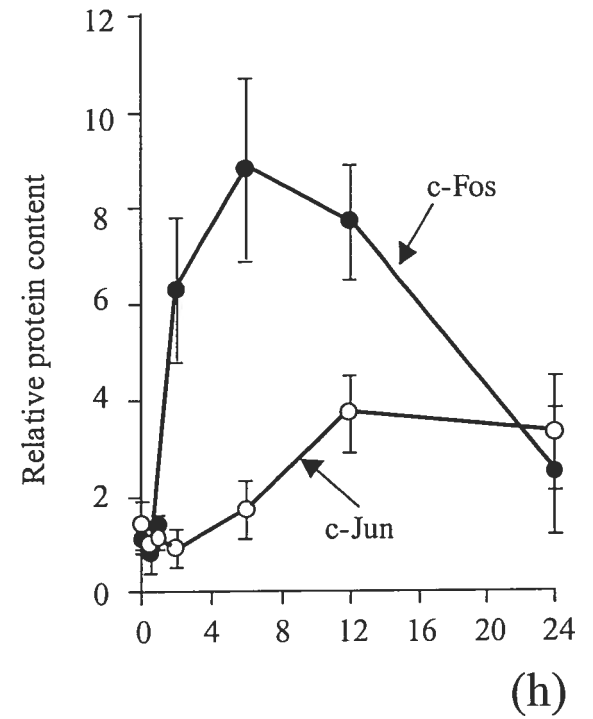
A**B**

Figure 2 : Effect of ouabain and potassium-depleted medium on the expression of c-Fos protein in quiescent VSMC

VSMC were incubated for 6 h in control medium with or without 1 mM ouabain or in potassium-depleted medium. Concentrations of Na⁺ and K⁺ in the media are shown at the top of the figure. The control media contained (mM): NaCl 121, KCl 5, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.8, NaHCO₃ 12, NaH₂PO₄ 0.9, Hepes 4.2 (pH 7.2), glucose 5, and vitamins and amino acids at concentrations indicated for Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) recipes. In potassium-depleted medium, KCl was substituted with NaCl.

Na ⁺ (mM)	134	139	
K ⁺ (mM)	5	0	
	└──────────┘		
Ouabain (1 mM)	-	+	-

c-Fos →

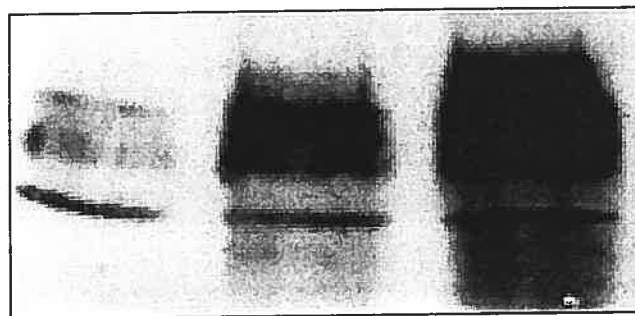


Figure 3 : Effect of ouabain on the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump, $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$ and expression of c-Fos protein in quiescent VSMC

A, dose dependency of the effect of ouabain on $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump activity (curve 1, ■) and intracellular content of exchangeable Na^+ and K^+ (curves 2, ●, and 3, ▲, respectively). Means \pm S.E.M. from experiments performed in quadruplicate are shown. *B*, representative Northern blot illustrating c-Fos expression after incubation of VSMC with different concentrations of ouabain 6 h. *C*, dose dependency of the ouabain effect on c-Fos expression. c-Fos content in the absence of ouabain was taken as 1.0. Means \pm S.E.M. from three experiments are shown.

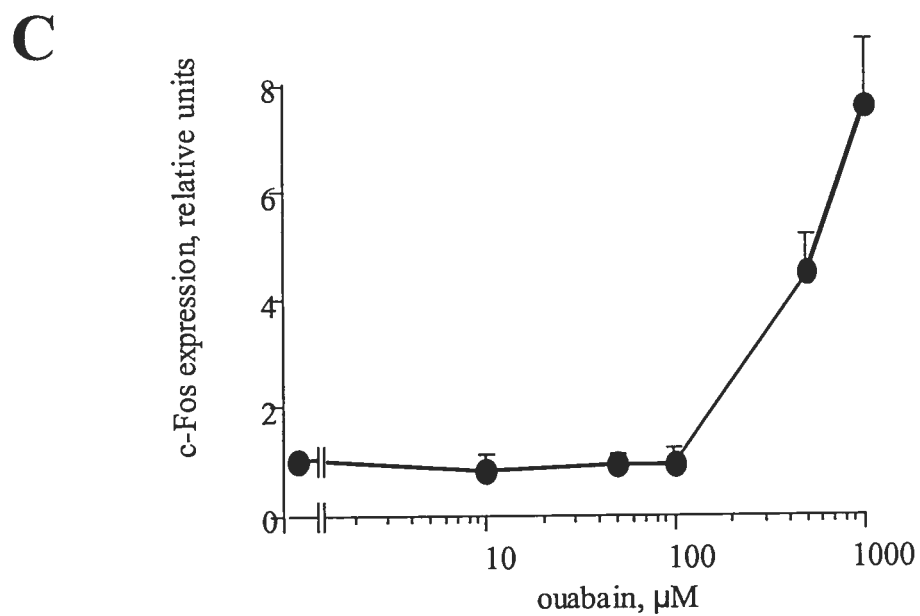
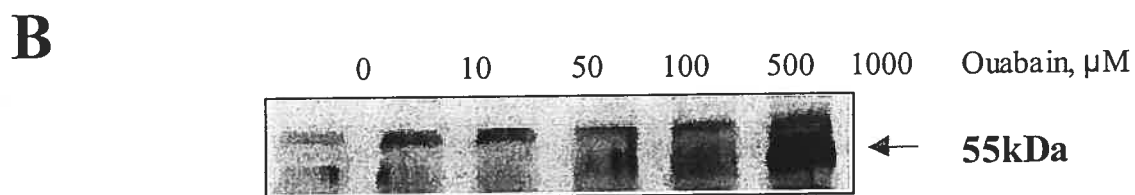
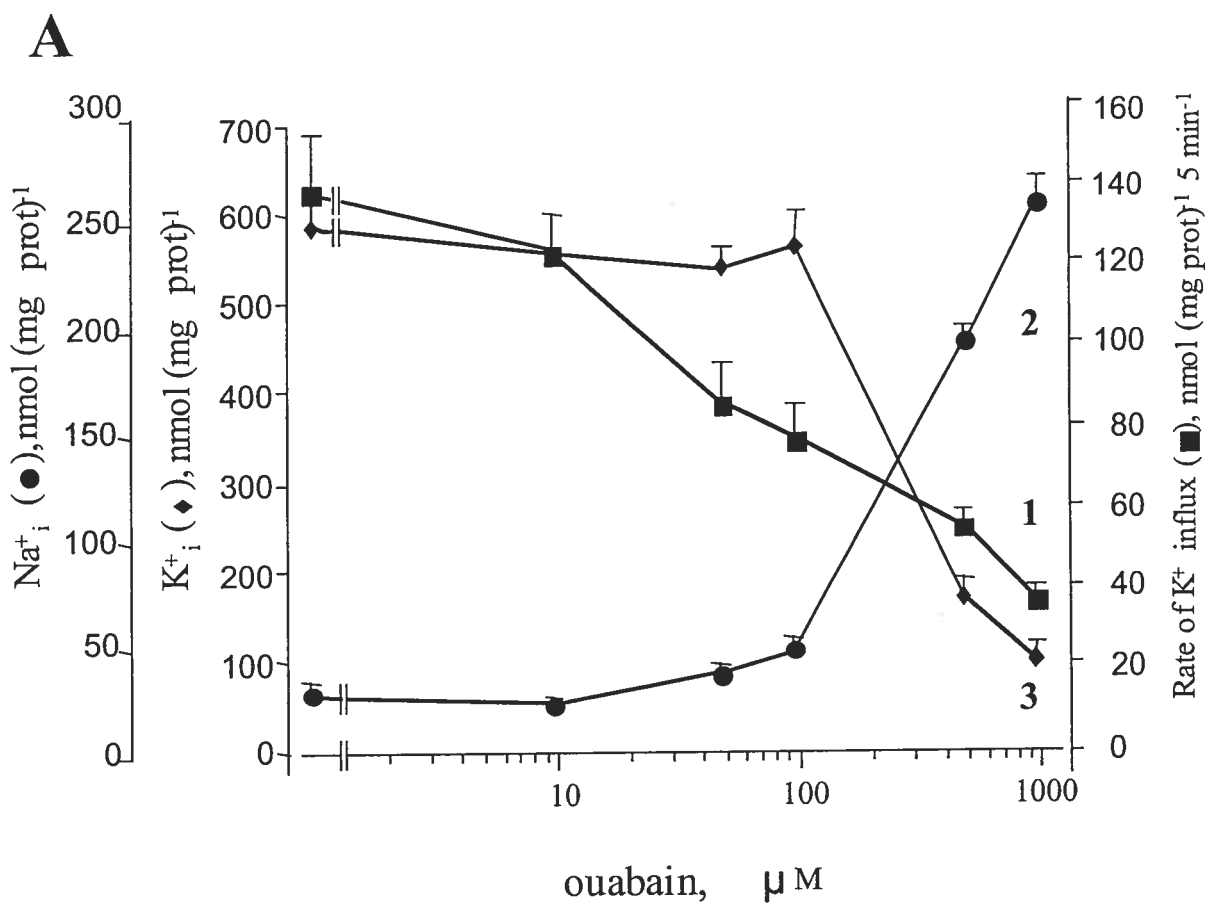


Figure 4 : Ouabain-induced modulation of $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{K}^+]_i$ and the c-Fos/S18 ratio

A, kinetics of the modulation by ouabain of $[\text{Na}^+]_i$ (1, ●) and $[\text{K}^+]_i$ (2, ○) content and the c-Fos mRNA/ribosomal S18 RNA ratio (3, ▲). To measure $[\text{Na}^+]_i$ and $[\text{K}^+]_i$, quiescent VSMC were preincubated for 6 h in DMEM with $0.5 \mu\text{Ci ml}^{-1} \text{}^{86}\text{RbCl}$ or $2 \mu\text{Ci ml}^{-1} \text{}^{22}\text{NaCl}$, and then aliquots of DMEM with the same radioactivity and 1 mM ouabain were added for the next 0.25, 0.5, 1, 2 and 5 h. The content of exchangeable Na^+ , K^+ and the c-Fos/S18 RNA ratio in the absence of ouabain was taken as 100 %. Means \pm S.E.M. from three (intracellular ions) and five (c-Fos mRNA) experiments are given. *B*, representative blot showing the kinetics of c-Fos mRNA expression in ouabain-treated VSMC.

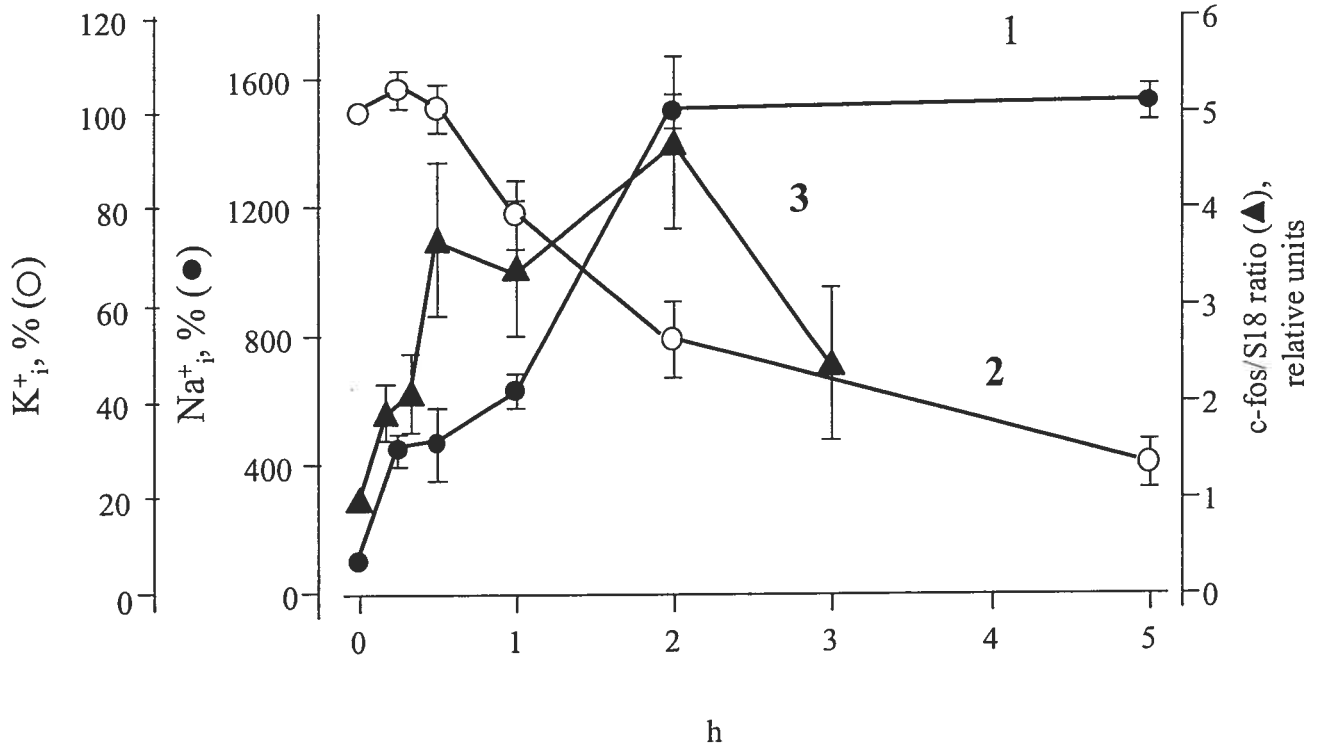
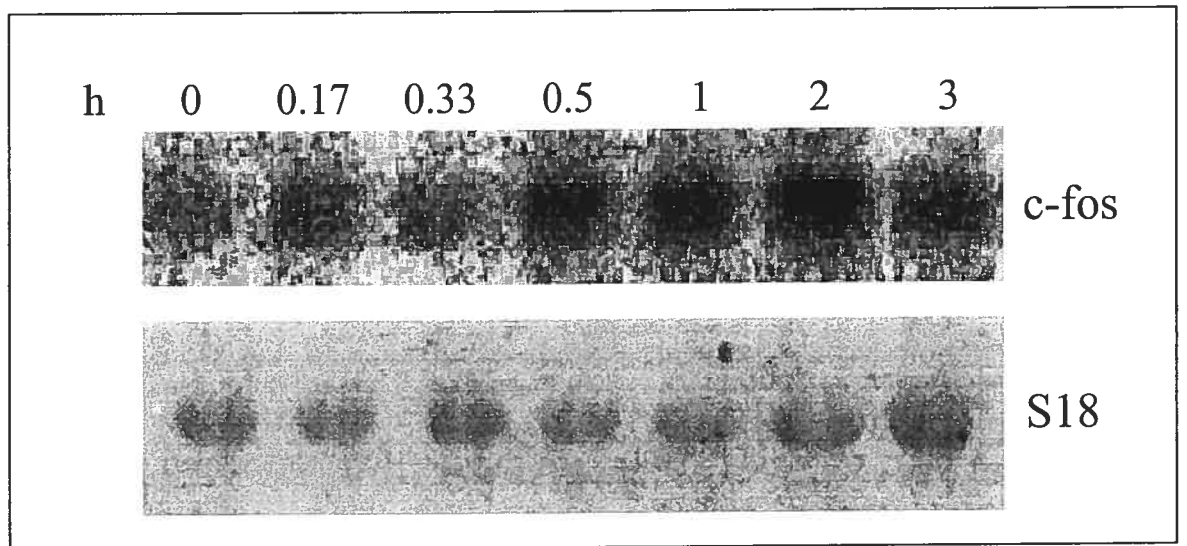
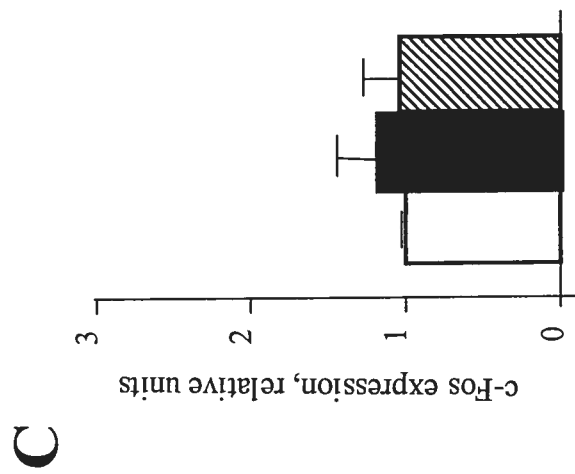
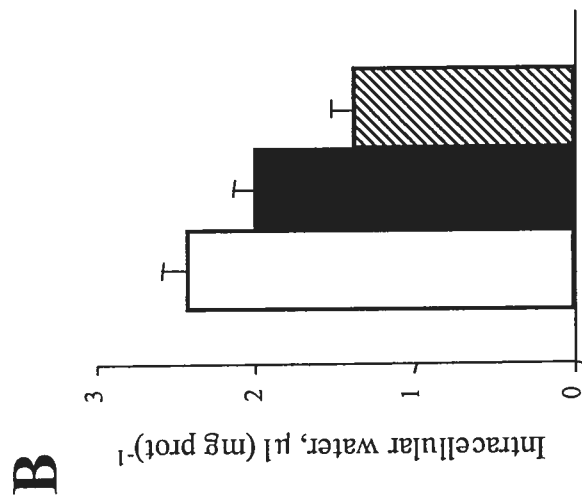
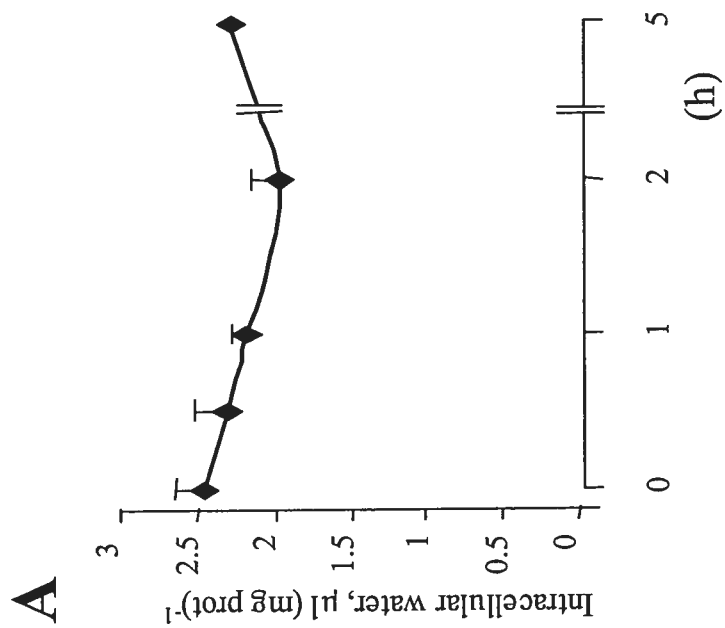
A**B**

Figure 5 : Role of cell volume in c-Fos expression

A, kinetics of cell volume modulation by ouabain. Quiescent VSMC were preincubated for 6 h in DMEM containing $2 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ [^{14}C]urea, and then ouabain was added at a final concentration of 1 mM. Means \pm S.E.M. from experiments performed in triplicate are given. **B**, effect of hyperosmotic medium on VSMC volume. The osmolality of the medium was increased by the addition of either 100 or 300 mM mannitol to DMEM. Means \pm S.E.M. from experiments performed in quadruplicate are given. **C**, effect of hyperosmotic medium on c-Fos protein expression. Quiescent VSMC were incubated in DMEM containing 100 or 300 mM mannitol for 6 h. c-Fos expression in the absence of mannitol was taken as 100 %. Means \pm S.E.M. from experiments performed in triplicate are given.



(□) control, (■) Mannitol 100 mM, (▨) Mannitol 300 mM

Figure 6 : Effect of nicardipine (0.1 μ M) on c-Fos protein expression after incubation of VSMC for 6 h in control and high-potassium media

For composition of the control medium, see Figure 2. In high-potassium medium, NaCl was substituted with KCl. Ouabain was added at final concentration of 1 mM.

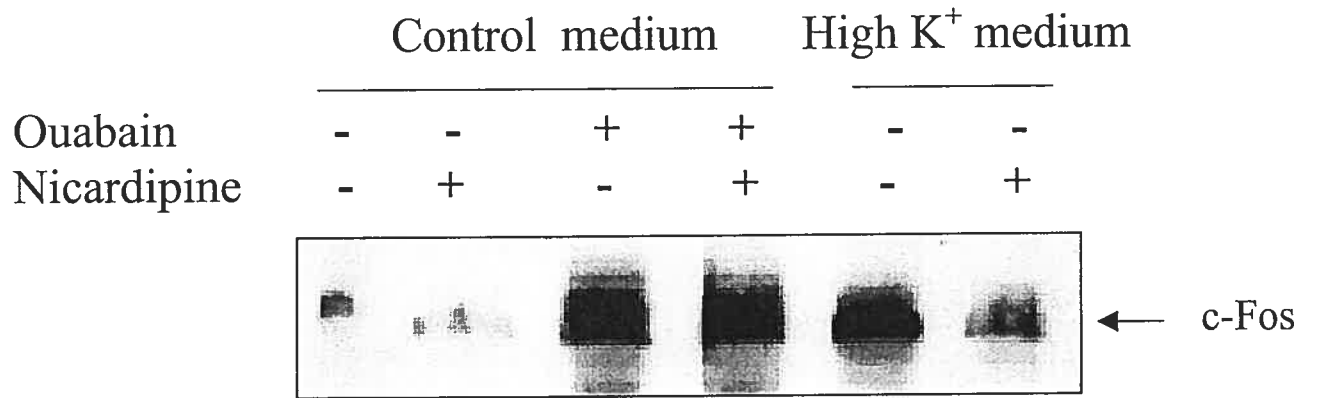


Figure 7 : $[Ca^{2+}]_i$ in control and ouabain-treated cells

A, representative records of the effect of ouabain and thapsigargin on free $[Ca^{2+}]_i$ measured in the total cell population. Additions of 1 mM ouabain and 0.5 μ M thapsigargin are shown by arrows. **B**, representative records of the effect of ouabain on the F_{340}/F_{380} ratio measured in five single cells by fluorescence ratio imaging. **C**, free $[Ca^{2+}]_i$ in the total population of control cells and cells treated with 1 mM ouabain for 40 min. Means \pm S.E.M. from six experiments are given. **D**, the F_{340}/F_{380} ratio in control cells and cells treated with 1 mM ouabain for 60 min. The values of F_{340}/F_{380} ratio in control cells was taken as 100 %. Means \pm S.E.M. from the analysis of five to six single cells in three experiments are given. **E**, the content of exchangeable $[Ca^{2+}]_i$ in control cells and cells treated with ouabain for 6 h. Means \pm S.E.M. from experiments performed in quadruplicate are given.

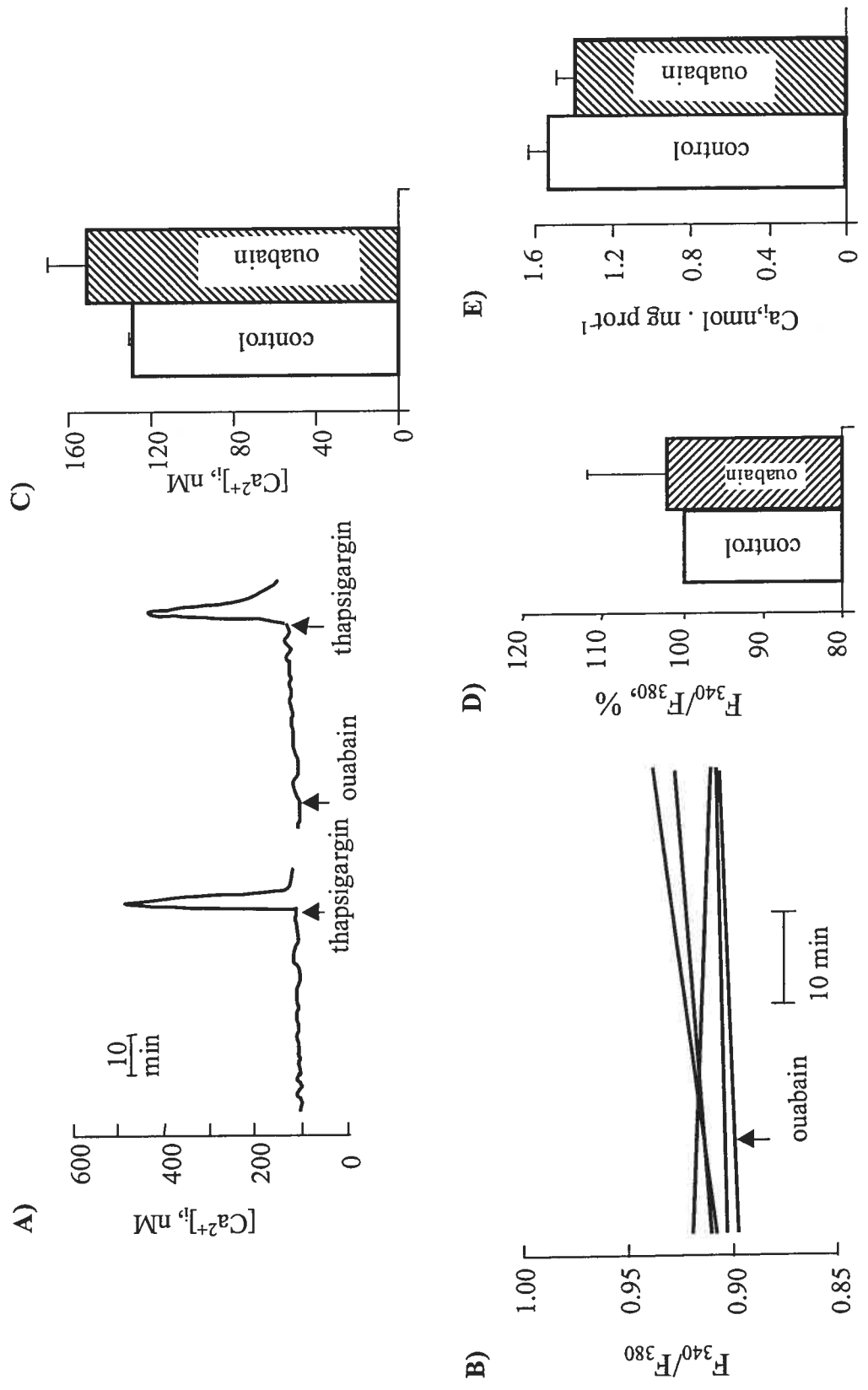


Figure 8 : Effect of ouabain on c-Fos protein expression in calcium-free medium and in BAPTA-loaded VSMC

Quiescent VSMC were incubated for 30 min in DMEM in the absence or presence of 20 μ M BAPTA-AM. This medium was then aspirated and the cells were incubated for the next 6 h in regular CaCl_2 -containing DMEM, in CaCl_2 -free DMEM or in CaCl_2 -free DMEM containing 0.1 mM EGTA, in the absence or presence of 1 mM ouabain.

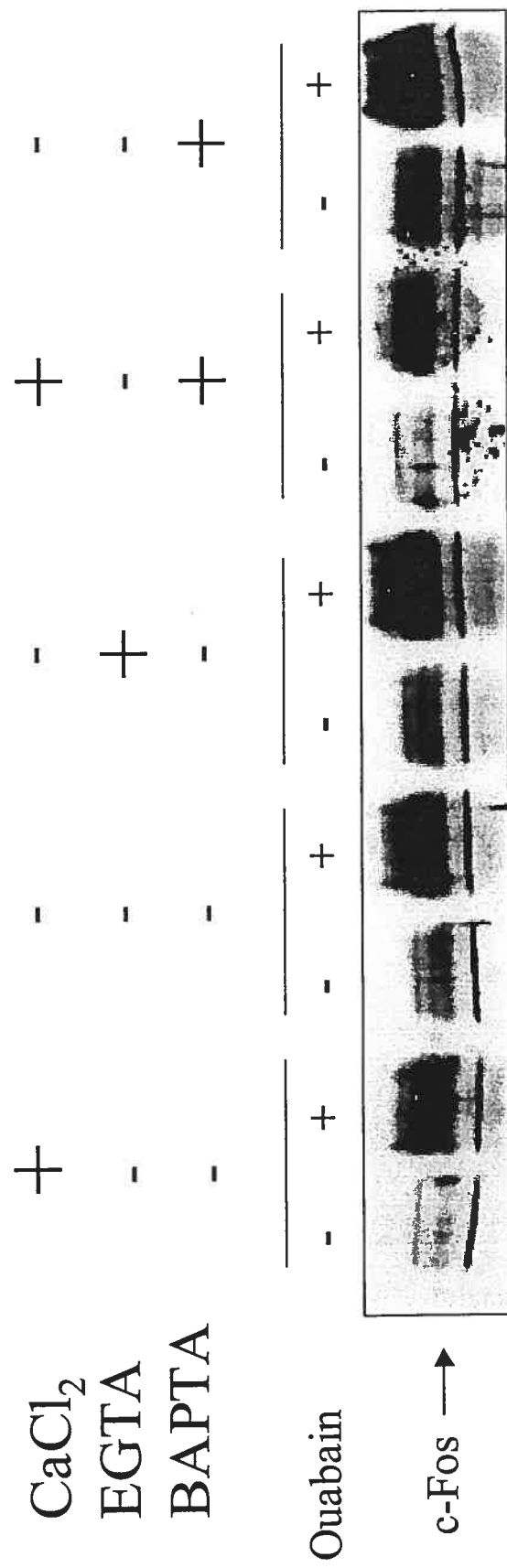
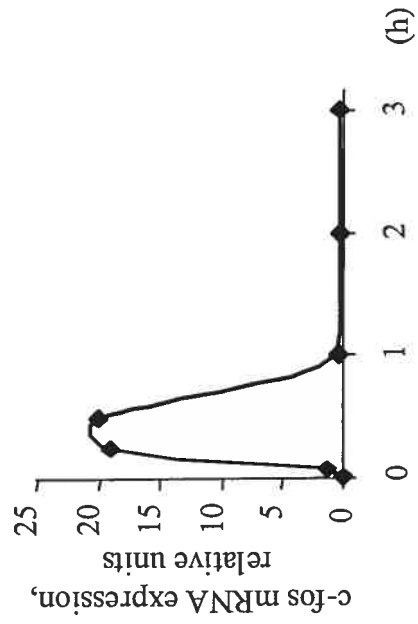
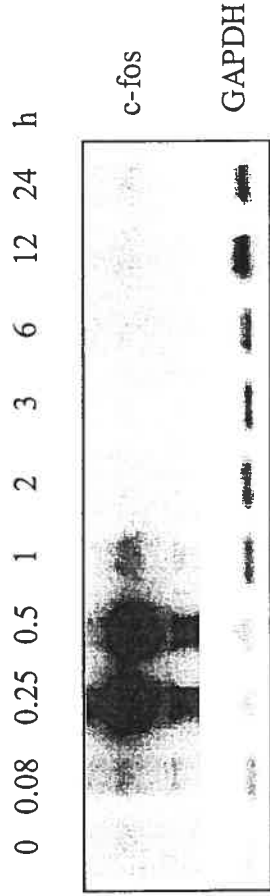


Figure 9 : Effect of serum on c-Fos mRNA (A) and protein (B) expression

Above each of the graphs a representative Northern and Western blot is presented showing c-Fos mRNA (A) and protein expression (B) after stimulation of quiescent cells with 10 % serum. **A**, kinetics of the increment in c-Fos mRNA in serum-treated VSMC. **B**, kinetics of the increment in protein content in serum-treated VSMC. Since serum time-dependently augmented GAPDH mRNA, we did not use its content to normalize c-Fos mRNA expression. The value of c-Fos mRNA and protein expression in untreated cells was taken as 100 %. Means \pm S.E.M. from three experiments are given.

A



B

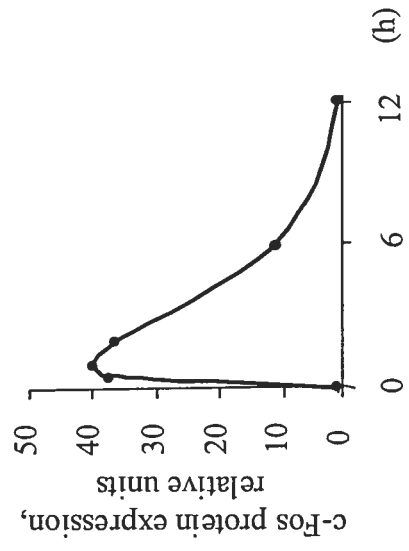
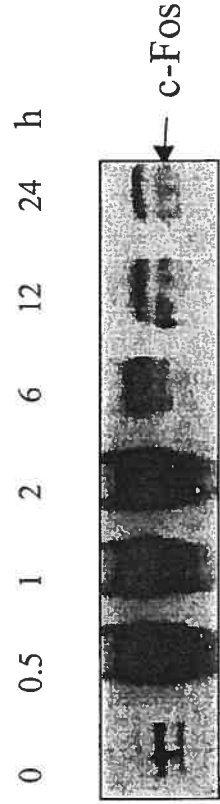


Figure 10 : Additive effect of serum and ouabain on c-Fos expression

A, representative blot showing c-Fos protein in control quiescent cells and cells treated with 1 mM ouabain and 10 % calf serum for 6 h. **B**, relative content of c-Fos protein after incubation with serum and/or ouabain. c-Fos content in untreated cells was taken as 1.0. Means \pm S.E.M. obtained from three experiments are shown.

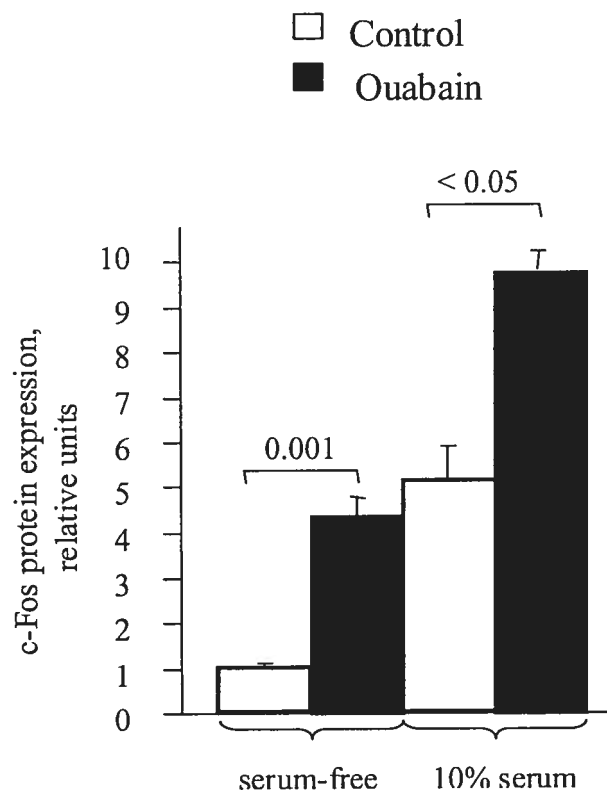
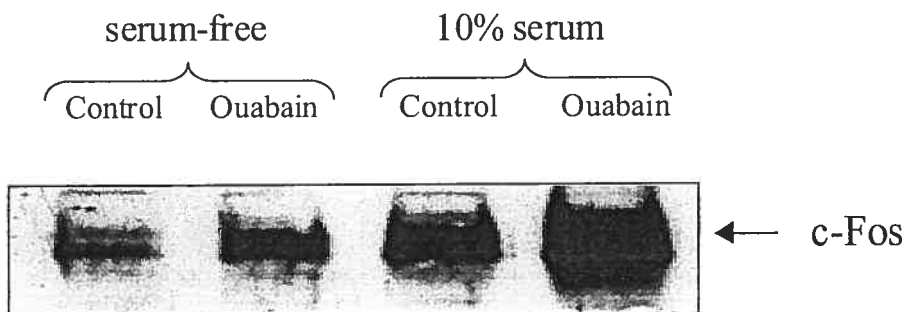


Table I : Effect of ouabain, serum, isoproterenol (Isop) and endothelin-1 (ET-1) on the activity of transcription factors in VSMC

Response element (transcription factor)	Luciferase activity (relative light units, % of control)		
	Control	Ouabain	Known inducers
SRE (Elk-1)	100 \pm 25	104 \pm 6	245 \pm 44 (serum)
SRE (SRF)	100 \pm 10	48 \pm 4	1,128 \pm 78 (serum)
CRE (CREB)	100 \pm 25	100 \pm 27	632 \pm 55 (Isop)
AP-1 (c-Fos/c-Jun)	100 \pm 3	67 \pm 13	663 \pm 50 (ET-1)

VSMC were transfected with the desired DNA and serum-starved for 24 h in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.2% calf serum, followed by incubation for an additional 6 h with or without 1 mM ouabain or 10% fetal bovine serum. The activity of transcription factors in the cell lysates was then measured by corresponding luciferase reporter assays (see Methods). Shown are means \pm S.E.M. from representative experiments performed in quadruplicate. (SRE, serum response element; SRF, serum response factor; CRE, cAMP/Ca²⁺ response element; CREB, CRE binding protein; AP-1, activator protein-1).

Résumé

L'élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ due à l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase augmente significativement la synthèse d'ARN dans les CMLV. Afin de déterminer les éléments intermédiaires entre la synthèse massive d'ARN et l'activation de l'expression de certaines protéines, comme la mortaline, impliquées dans la réponse anti-apoptotique, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase sur l'expression des gènes de réponse primaire.

L'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase permet une induction rapide de l'expression de la protéine c-Fos, l'expression de la protéine c-Jun est également affectée mais son induction est beaucoup plus lente. En revanche aucun effet n'a pu être observé sur l'expression des protéines ATF-2, CREB et c-Myc. Une forte élévation de l'expression de c-Fos est également observée dans les CMLV incubés dans un milieu dépourvu de K^+ . L'étude de l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ ATPase met en évidence que l'élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ conditionne l'expression de c-Fos. D'autre part, une comparaison de la $[Na^+]_i$, de la $[K^+]_i$ et de l'expression de c-Fos démontre que l'induction de c-Fos est directement dépendante d'une élévation de la $[Na^+]_i$ mais indépendante de la diminution de la $[K^+]_i$.

Une élévation de la $[Na^+]_i$ est capable d'affecter plusieurs paramètres dans la cellule tels que le pHi, le volume cellulaire et la concentration en Ca^{2+} libre.

L'incubation des CMLV en présence de ouabaïne n'a aucun effet sur le pHi et bien que le volume cellulaire décroisse de façon transitoire, cette diminution du volume cellulaire n'affecte pas l'expression de c-Fos. De plus, la ouabaïne n'affecte pas la $[Ca^{2+}]_i$ libre ou le contenu en $[Ca^{2+}]_i$ échangeable. L'expression de c-Fos est également indépendante des canaux Ca^{2+} de type L, de la présence du Ca^{2+} extracellulaire et de la présence de chélateurs calciques extracellulaire (EGTA) ou intracellulaire (BAPTA).

L'incubation des CMLV en présence de sérum démontre que les effets de la ouabaïne et du sérum sur l'expression de c-Fos sont additifs. Dans le but de déterminer la région du promoteur du gène c-fos sensible à l'élévation de la $[Na^+]_i$, des études préliminaires ont mis en évidence que l'effet de la ouabaïne, à l'inverse du sérum, est indépendant des éléments

du promoteur Elk-1, SRE, CRE et AP-1, impliqués dans la régulation de l'expression basale de *c-fos*.

Ces résultats démontrent l'existence d'éléments sensibles à la $[Na^+]_i$ mais indépendants de la $[Ca^{2+}]_i$ et susceptibles d'affecter l'expression de la protéine c-Fos indépendamment des éléments du promoteur impliqués dans le contrôle de son expression basale.

CHAPITRE 4

ARTICLE 3

Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells

Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN, Tremblay TL, Thibault P, Bennett MR,
Hamet P, Pshezhetsky AV

Circulation research, 2002 Nov 15;91(10):915-22

**Proteome analysis and functional expression identify mortalin
as an anti-apoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$
ratio in cultured vascular smooth muscle cells.**

Sebastien Taurin², Volkan Seyrantepe¹, Sergei N. Orlov², Tammy-Lynn Tremblay³, Pierre Thibault³, Martin R. Bennett⁴, Pavel Hamet² and Alexey V. Pshezhetsky¹

¹Centre de recherche de l'Hôpital Sainte Justine, 3175 côte Ste-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada; ²CHUM-Hôtel Dieu, Centre de recherche, 3840 rue Saint Urbain, Montréal, (Québec) H2W 1T8, Canada; ³Institute for Biological Sciences, 100 Sussex Drive, Ottawa, (Ontario) K1A 0R6, Canada; ⁴Departments of Medicine, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QQ, UK.

Short title: Mortalin inhibits apoptosis in VSMC

Subject codes: 115, 131, 152

Key words : apoptosis, vascular smooth muscle, proteome, ion transport, p53, ouabain.

*- To whom correspondence should be addressed:

Service de génétique médicale, Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montréal (Qc) H3T 1C5 - Canada
Tel. (514) 345-4931/2736
Fax. (514) 345-4801

E.-Mail: [REDACTED]

SUMMARY

Apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC) plays an important role in remodelling of vessel walls, one of the major determinants of long-term blood pressure elevation and an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Recently we have found that apoptosis in cultured VSMC can be inhibited by inversion of the intracellular $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$ ratio after the sustained blockage of the Na^+, K^+ -ATPase by ouabain. To understand the mechanism of ouabain action we analyzed subsets of hydrophilic and hydrophobic VSMC proteins from control and ouabain-treated cells by 2-dimensional electrophoresis. Ouabain treatment led to overexpression of numerous soluble and hydrophobic cellular proteins. Among proteins, which showed the highest level of ouabain-induced expression we identified mortalin (also known as GRP75 or PBP-74), a member of the HSP70 superfamily and a marker for cellular mortal and immortal phenotypes. Northern and western blotting and immunocytochemistry all have confirmed that treatment of VSMC with ouabain results in potent induction of mortalin expression. Transient transfection of cells with mortalin cDNA lead to at least a 6-hour delay in the development of apoptosis after serum deprivation. The expression of tumour suppressor gene, p53 in mortalin-transfected cells was delayed to the same extent and the expressed protein showed abnormal perinuclear distribution suggesting that p53 is retained and inactivated by mortalin. Our studies therefore define a new $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -responsive signaling pathway that may play an important role in the regulation of programmed cell death in VSMC.

INTRODUCTION

Remodelling of the blood vessel plays an important role in a variety of human vascular disorders, including hypertension (1-3), atherosclerosis, (4) arterial injury, and restenosis after angioplasty (5-7). Apoptosis (programmed cell death) of vascular smooth muscle cells (VSMC) has recently been identified as the main factor contributing to the regulation of their number during remodelling (8-12), which inspired numerous studies of the mechanisms of the induction and progression of VSMC apoptosis. The execution phase of apoptosis in VSMC is triggered similarly to that in the other cell types by activation of the caspase cascade, cleavage of intracellular proteins and final disintegration of the cell. In contrast, the induction phase is specific for different subtypes of remodeling and involves the integration of multiple pro- and anti-apoptotic signals, including the expression of death receptors, proto-oncogenes and tumour suppressor genes (13-19).

Our recent studies showed that inhibition of VSMC Na^+, K^+ pump with ouabain, or in K^+ -free medium, rescues cells from apoptosis triggered by a number of factors including serum deprivation (20). Equimolar substitution of extracellular Na^+ with K^+ completely abolished the effect of ouabain (20) showing that antiapoptotic action was indeed caused by the inversion of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio. The development of cell death was blocked upstream of Caspase-3 activation (20) and was cell specific (20-24).

The mechanism of the observed phenomenon most probably involves upregulation of anti-apoptotic proteins induced by the elevation of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio because ouabain significantly induced DNA and RNA synthesis in treated VSMC (25, 26), whereas inhibitors of RNA and protein synthesis, completely abolished antiapoptotic action of ouabain (25). In this study, we analysed the VSMC proteome to identify proteins induced after the inhibition of Na^+, K^+ -pump. Among identified gene products, a HSP70 family protein, mortalin was shown to inhibit VSMC apoptosis via inactivation of pro-apoptotic tumour suppressor gene, p53.

MATERIALS AND METHODS

Cells

VSMC from the aorta of male BN.lx rats and VSMC-E1A cells stably transfected with E1A adenoviral protein were obtained as described (27, 28) and cultured in Dulbecco's modified eagle medium with 10% calf serum (CS).

Proteomic analysis

Cells were extracted with 40 mM Tris base buffer pH 9.5, and then with 8 M urea, 4% CHAPS and 2 mM TBP (29). Extracts were loaded by rehydration on non-linear immobilized pH gradient 18 cm strips 3-10 (Pharmacia).

2DE was performed as described previously (29). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, scanned and analysed using PDQuest software (Bio-Rad). To create the composite gels, 5 gels of the similar samples were aligned and the relative intensities of matched individual protein spots were averaged. Proteins that showed at least 2-fold difference in intensity between composite gels of control and ouabain-treated cells and which expression level was changed on all individual gels were excised for identification.

Gel pieces containing selected protein spots were treated overnight with trypsin (Promega). Peptide fragments were extracted and analysed by mass spectrometry.

NanoLC-MS-MS experiments were conducted on a Q-TOF 2 hybrid quadrupole/time-of-flight equipped with a CapLC (Micromass, Manchester, UK) liquid chromatograph. Chromatographic separations were achieved on a Pepmap C18 precolumn (LC Packings, San Francisco, CA). Protein identification was conducted using Mascot (Matrix science, London, UK) with a NCBI protein database.

Immunofluorescence microscopy of VSMC

Cells were treated with MitoTracker MitoFluor Red 594 (Molecular Probes, Eugene, OR), fixed with 3% paraformaldehyde, permeabilized by 0.3% Triton X-100 and stained with mouse monoclonal anti-mortalin antibodies or anti-p53 antibodies and counterstained with oregon green 488-conjugated anti-mouse IgG antibodies. Finally cells were stained with DAPI. Slides were studied on a Zeiss LSM510 inverted confocal

microscope (Carl Zeiss Inc., Thornwood) or Nikon Eclipse E6000 direct epifluorescence microscope.

Western and northern blotting

VSMC lysates were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred to PVDF membrane. The detection was performed with monoclonal anti-human mortalin antibodies or anti-human p53 antibodies.

Ten μg of total VSMC RNA was separated by a 1% agarose-formaldehyde gel electrophoresis and blotted onto Hybond-N⁺ membrane. Mortalin and β -actin cDNA probes were labelled with [³²P]-dCTP using a multiprime DNA labelling kit (Amersham-Pharmacia Biotech).

Expression of mortalin in VSMC-E1A cells

Mammalian expression vector pCMV-SPORT-Mot containing human mortalin cDNA was obtained from Research Genetics. VSMC were transiently transfected with pCMV-SPORT-Mot and pIRES2-EGFP-Mot expression vectors using Effectene reagent (Qiagen). pCMV-SPORT and pIRES2-EGFP vectors were used for mock-transfection.

RESULTS

Proteome changes in ouabain-treated cells

To identify VSMC proteins which expression was significantly changed by ouabain we have compared 2DE (2-dimensional electrophoretic) maps of VSMC proteome. To increase sensitivity we performed a sequential extraction of VSMC proteins first with buffer solution to extract all soluble proteins (~40-50 % of total cell protein) and then with detergent to extract hydrophobic cellular proteins (~40% of protein). Altogether ~ 370 protein spots were detected in buffer extracts and ~ 260 protein spots in detergent extracts. To create the composite gels (figure 1) 5 gels of the similar samples were aligned and the relative intensities of matched individual protein spots were averaged. The most significant changes in response to ouabain treatment were detected in the pool of soluble proteins (figure 1A) (142 proteins induced, 56 proteins suppressed), whereas only 16 hydrophobic proteins were induced and 48 suppressed in ouabain-treated VSMC (figure 1B). For identification we selected proteins that showed at least 2-fold difference in intensity on composite gels between control and ouabain-treated cells and which expression level was changed on all individual gels in the same series of gels (Figure 1).

Twenty proteins which expression was induced or suppressed in ouabain-treated cells were positively identified with at least 3 MS-MS spectra by nanoLC-MS-MS (table I). Most of proteins showed good correlation within the experimental error range of determined Mr and pI values with those predicted from their amino acid sequences but some showed significantly reduced experimental mass, suggesting that they were products of proteolytic degradation. For example 78 kDa glucose-regulated protein (BIP), vimentin, and actin were represented by both full-length proteins and fragments whereas calmodulin and heat shock cognate 71 kDa protein were represented only by fragments (table I). Because cellular proteins were always extracted in the presence of protease inhibitors and protein fragments were detected only in ouabain-treated VSMCs, it is likely that proteolysis took place in living cells, but at this point we have no explanation for this phenomenon. Also, a group of histones showed remarkable difference between the theoretical (10.5-11.7) and experimentally determined (4.5-5.6) pI values. Posttranslational modifications such as acetylation and methylation of the basic amino acid residues frequently found in the histone

sequences could be partially responsible for this discrepancy (30). It is also possible that during a separation in the first dimension histones stay as protein-DNA complexes with acidic pI values. After denaturing with SDS before the second dimension histones lose their ability to bind DNA and run on the SDS PAGE according to their molecular weight. Experimental pI values in the acidic pH range were also determined for histones by other authors (31). No changes in posttranslational modification were detected within the amino acid sequence observed by MS but this does not preclude changes in the other regions of the protein.

We observed that ouabain changed expression level of different groups of cellular proteins including: cytoskeleton and associated proteins (vimentin, actin, vinculin, myosin); plasma membrane proteins and receptors (annexin I, α -macroglobulin receptor-associated protein); DNA-binding proteins and proteins involved in the regulation of DNA synthesis (histones, nucleophosmin, prohibitin); Ca^{2+} -binding proteins (calmodulin) as well as glycolytic and mitochondrial enzymes (GAPDH, α -enolase, aldehyde dehydrogenase). One spot was identified as a rat analog of a hypothetical human protein FLJ14844 with unknown. However a group of heat shock proteins (GRP78, HSC70, HSP47) and, in particular, mitochondrial stress-70 protein, mortalin also called GRP75 and PBP-74 (reviewed in Wadhwa *et al* 32) were most significantly induced by ouabain. This assignment was based on on-line nanoLC-MS-MS results. An example of this is shown in figure 2 for two of the thirteen MS-MS spectra obtained from spot 2 (table I). In both cases, the MS-MS spectra are dominated by cleavage of the peptide bond giving rise to y-type fragment ions with charge retention on the C-terminus segment of the precursor ion. Since previous works showed that mortalin over-expression could rescue NIH 3T3 and carcinoma cells from apoptosis induced by serum starvation, UV- and γ -irradiation (33, 34) we have concentrated our further studies on this particular protein.

Expression of mortalin in ouabain-treated VSMC

Northern blot showed a 5-fold increase of the mortalin RNA after 2 hours of ouabain treatment (figure 3A), whereas western blot demonstrated that the level of mortalin protein started to increase already after 30 min of treatment and reached its maximum 3 hours after (figure 3B).

Anti-mortalin immunofluorescence in VSMC was associated with punctate structures co-localized with the mitochondrial marker MitoTracker Red (figure 3C) and distributed with a gradient of concentration from the plasmatic to the nuclear membrane. The cells treated with ouabain for 2 hours showed similar localization of mortalin but the intensity of staining significantly increased reflecting high expression level of the protein (figure 3C).

Expression of mortalin in VSMC results in their increased resistance to serum-deprivation induced apoptosis

We expressed mortalin in VSMC to understand if this protein is involved in the inhibition of apoptosis. Preliminary experiments showed that VSMC are highly resistant to transfection. Under optimal conditions only 25 to 30% of cells expressed a reporter β -galactosidase gene (not shown). To overcome this problem we used VSMC-E1A cells, stably transfected with E1A-adenoviral protein (28), which showed 96 to 98% transfection efficiency under similar conditions (not shown). Another advantage of using VSMC-E1A cells was their high susceptibility to apoptosis induced by serum-deprivation as compared to wild-type VSMC (28). VSMC-E1A showed a similar to wild-type VSMC effect of ouabain on the development of apoptosis (20).

VSMC-E1A were transfected with pCMV-SPORT-Mot vector containing a full length human mortalin cDNA. Western blot analysis of the transfected cells (figure 4) revealed expression of a full-size mortalin protein. Forty-eight hours after transfection cells were placed in serum-free medium and at time intervals indicated on figure 5, were fixed and stained with DAPI. The number of apoptotic cells was then counted either based on chromatin condensation using epifluorescence microscopy or on cell morphology using phase contrast microscopy (figure 5A and B). Both methods showed that the rate of apoptosis in VSMC-E1A transfected with mortalin cDNA was significantly reduced during the first 6 hours after serum deprivation. For example only ~15% of mortalin-transfected cells showed condensed nuclei 2 hours after serum deprivation as compared to more than 30% in mock-transfected cells (figure 5A). During the first 4 hours the effect of mortalin on cell survival was comparable to that of ouabain, but ouabain provided long-term (up to 24 hours) protection (figure 5B). As in the case of ouabain treatment transfection of

VSMC-E1A with mortalin cDNA resulted in almost two-fold inhibition of Caspase-3 activity measured 2 hours after serum deprivation (figure 5C).

Since the commercially available monoclonal anti-human mortalin antibodies were also specific against the endogenous rat protein, it was difficult to discriminate between transfected and non-transfected cells using immunofluorescence microscopy. Therefore to estimate the rate of apoptosis specifically in mortalin-expressing cells we have transfected VSMC-E1A with mortalin cDNA using a pIRES2-EGFP-Mot vector that allowed mortalin and a transfection marker, green fluorescent protein (GFP) to be translated from a single bicistronic mRNA. As in the previous experiment, forty-eight hours after transfection cells were incubated in serum-free medium, fixed and stained with DAPI. Immunofluorescence microscopy showed that GFP-positive cells had much higher resistance to apoptosis induced by serum deprivation than GFP-negative non-transfected cells (not shown).

Mortalin inhibits apoptosis in VSMC via the inactivation of p53

Previous studies have demonstrated that serum-deprivation induced apoptosis in VSMC, in particular in VSMC-E1A is executed by p53-dependent mechanism (28, 35, 36). In agreement with this we found that serum deprivation of wild-type or mock-transfected VSMC-E1A resulted in rapid induction of p53 (~4-fold increase 1 hour after deprivation, figure 6A). In contrast, the induction of p53 in mortalin-transfected cells was delayed for about 6 hours (figure 6A) suggesting that mortalin may inhibit apoptosis in VSMC by reducing the level of p53. Immunofluorescent microscopy showed the predominantly nuclear localization of p53 in serum-deprived VSMC, but majority of mortalin-transfected cells showed a juxtannuclear staining pattern (figure 6B). Colocalization of p53 and mortalin previously observed in mortalin-transfected NIH 3T3 cells (32, 37) suggested the cytoplasmic retention/abrogation of the nuclear translocation of p53 whereas recent studies directly showed that the N-terminal region of mortalin binds to a C-terminal cytoplasmic sequestration domain of p53 (38).

DISCUSSION

A number of VSMC in vessel walls is regulated by the balance between proliferation, senescence and apoptosis. These cells have an effective mechanisms to discriminate between these conditions in response to diverse stimuli such as mechanical forces, reactive oxygen and nitrogen species, cytokines, growth factors etc. The tumor suppressor p53 controls at least in part both growth and senescence of VSMC (39-43) as well as their apoptosis (35, 44-47). In this work we demonstrate the existence of a new $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -responsive signaling pathway for the control of apoptosis in VSMC that allows these cells to inactivate p53 through the induction of HSP70 family protein, mortalin.

To characterize changes in a proteome of VSMC induced by ouabain treatment that inversed $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio and inhibited serum deprivation-induced apoptosis, we analysed subsets of hydrophilic and hydrophobic VSMC proteins from control and ouabain-treated cells by 2DE. 2DE-MS approach permits to study only the part of cellular proteome since proteins of medium to low abundance as well as transmembrane proteins are usually not detected (48) and other methods such as recently described isotope-coded affinity tags (ICAT) approach (49) should be implemented to complete the characterization of the VSMC proteome. Nevertheless, 2DE-MS method revealed than ouabain treatment results in significant changes in the expression level of numerous VSMC proteins. One of those proteins, mortalin, was directly implicated in apoptosis regulation.

Northern and western blotting and immunocytochemistry all have confirmed that the inhibition of VSMC apoptosis after sustained increase of $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio by ouabain is accompanied by potent induction of mortalin expression. Previous studies have shown two different types of intracellular localization of mortalin, pancytosolic and perinuclear. In mortal cells the protein is widely distributed in the cytoplasm whereas in immortal cells the protein shows mitochondrial juxtannuclear distribution, or fibrous staining with perinuclear concentration (50). Perturbation of the pancytosolic and overexpression of the perinuclear form was observed in most of tumors and tumor-derived cell lines showing progressive increase with malignancy (33, 37, 51).

In our studies mortalin-transfected VSMC showed a 6-hour delay in the development of apoptosis after serum deprivation. Within this period the amount of

morphologically changed apoptotic cells, or cells that exhibited chromatin condensation and blebbing of the nuclei was reduced about 2-fold as compared to control cells. Caspase-3 activity level was also reduced showing that the development of apoptosis was suppressed at a step before the activation of this enzyme.

Western blotting and immunocytochemistry revealed that the expression of p53 in mortalin-transfected cells was delayed and the expressed protein was not located at the nuclei but rather showed perinuclear distribution suggesting binding of mortalin to p53 which results in unfolding and inactivation of the latter protein (52). The inactivation of p53 by mortalin in VSMC is apparently a part of their physiological response to inversion of the $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio and may be also a component of their defensive mechanism against apoptosis. The changes in p53 expression have not been directly detected in proteomic studies probably because the expression level of p53 was below the detection limit of the 2DE-MS method.

The protective effect of mortalin was lower and less prolonged than that of ouabain, suggesting that mortalin induction is only one of anti-apoptotic mechanisms triggered by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in VSMC. Some of these mechanisms could involve chaperones of HSP70 family such as HSC70 and GRP78 (BIP) which directly bind p53 in the process of anti-apoptotic response (reviewed in Zylick *et al* 53). Both HSC70 and GRP78 (BIP) were found induced in ouabain-treated VSMC in this study (table I and figure 1). Recent data also showed that co-chaperone HSP40 affects interactions of HSP70 and HSP90 with the wild-type p53 (54). In particular, HSP90 and HSP40 displace each other from the complex with p53, suggesting that they may compete for the same p53 domains (54). Interestingly, the expression level of rat HSP40 protein, GP46 was two-fold reduced by ouabain treatment (table I and figure 1), which could additionally facilitate the formation of mortalin-p53 complexes. Another potential anti-apoptotic protein induced by ouabain is a mitochondrial chaperone, prohibitin (PHB). Originally identified as putative negative regulator of the cell cycle, PHB was recently shown to protect B cells against apoptosis caused by topoisomerase inhibition (55). Experiments that should demonstrate whether the induction of PHB, HSC70 and BIP and suppression of GP46 are also part of ouabain-induced anti-apoptotic mechanism are presently in progress in our laboratory.

It is tempting to speculate that mortalin-p53 interactions may be involved in the regulation of apoptosis, senescence and proliferation of VSMC in several different types of remodeling. For example both early senescence and p53-induced apoptosis observed in the VSMC from atherosclerotic plaques (39) are consistent with “senescent phenotype” of cells that have predominantly pancytoplasmic distribution of mortalin. In contrast, reduced apoptosis and increased proliferation of VSMC during neointimal response to injury could be due to the p53 inactivation by the perinuclear mortalin pool. If this is the case, mortalin may be potentially important pharmaceutical target for selective modulation or inhibition of apoptosis in the vessel wall. In particular, inhibitors of mortalin may induce apoptosis in VSMC and therefore be helpful for limiting vascular lesions associated with restenosis.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Dr. Mila Ashmarina for stimulating discussions and Liliane Gallant for help in preparation of the manuscript. This work was supported in part by the operating grant from Canadian Institutes of Health Research MT-38107 to A.V.P. and MT-10803 to P.H. and S.N.O. as well as by the equipment grant from Canadian Foundation for Innovation to A.V.P. V.S. acknowledges a post-doctoral fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 1982;62:347-504.
2. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SY, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes or remodelling and growth. *Hypertension.* 1993;21:391-397.
3. Mulvany MJ, Baandrup V, Gundersen HJG. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a 3-dimensional director. *Circ Res.* 1985;57:794-800.
4. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *New Engl J Med.* 1987;316:1371-1375.
5. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodelling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *J Am Med Assoc.* 1994;271:289-294.
6. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodelling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation.* 1994;89:2816-2821.
7. Geary RL, Williams JK, Golden D, Brown DG, Benjamin ME, Adams MR. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodelling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:34-43.

8. Cho A, Courtman D, Langille L. Apoptosis (programmed cells death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res.* 1995;76:168-175.
9. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rats. *Circ Res.* 1997;81:328-337.
10. Kumar A, Lindner V. Remodelling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2238-2244.
11. Hamet P, Richard L, Dam TV, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995;26:642-648.
12. Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, et al.. Excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension.* 2001;37:760-766.
13. Fukuo K, Hata S, Suhara T, et al. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1996;27:823-826.
14. Fukuo K, Nakahashi T, Nomura S, et al. Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis. *Gerontology.* 1997;43:35-42.
15. Sandau, K, Pfeilschiffer J, Brune B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int.* 1997;52:378-386.
16. Messmer UK, Ankarcona M, Nicotera P, Brune B. P53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 1994;355:23-26.

17. Zhao ZH, Francis CE, Welch G, Loscalzo J, Ravid K. Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta*. 1997;1359:143-152.
18. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2200-2208.
19. Xie KP, Wang YF, Huang SY, et al. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene*. 1997;15:771-779.
20. Orlov SN, Thorin-Trescases N, Kotelevtsev SV, Tremblay J, Hamet P. Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J Biol Chem*. 1999;274:16545-16552.
21. Isaev NK, Stelmashook EV, Halle A, et al. Inhibition of Na^+,K^+ -ATPase activity in cultured cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neurosci Lett*. 2000;283:41-44.
22. Zhou X, Jiang G, Zhao A, Bondeva T, Hirzel P, Balla T. Inhibition of Na,K -ATPase activated PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-PK1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285:46-51.
23. Penning LC, Denecker C, Vercaemmen D, Declercq W, Schipper RG, Vandenaabeele P. A role for potassium in TNF-induced apoptosis and gene-induction in human and rodent tumour cell lines. *Cytokine*. 2000;12:747-750.
24. McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in adrogen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2000;60:3807-3812.

25. Orlov SN, Taurin S, Thorin-Trescases N, Dulin NO, Tremblay J, Hamet P. Inversion of the intracellular Na^+/K^+ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle cells via induction of RNA synthesis. *Hypertension*. 2000;35:1062-1068.
26. Orlov SN, Taurin S, Tremblay J, Hamet P. Inhibition of Na^+,K^+ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio: possible implication in vascular remodelling. *J Hypertens*. 2001;19:1559-1565.
27. Hadrava V, Tremblay J, Hamet P. Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1989;13:589-597.
28. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and independent pathways. *Circ Res*. 1995;77:266-273.
29. Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19:837-844.
30. Berger SL. Histone modifications in the transcriptional regulation., *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12:142-148.
31. Scherl A, Coute Y, Deon C, Sanchez J-C, Greco A, Kindbeiter K, Hoogland C, Hochstrasser DF, Diaz J-J. Direct submission to the SWISS-2DPAGE database; 2001. URL: <http://us.expasy.org/cgi-bin/nice2dpape.pl?P02304>; accession number: P02304.
32. Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y. Cellular mortality and immortalization: a complex interplay of multiple gene functions. *Prog Mol Subcell Biol*. 1999;24:191-204.
33. Wadhwa R, Takano S, Mitsui Y, Kaul SC. NIH 3T3 cells malignantly transformed by mot-2 show inactivation and cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *Cell Res*. 1999;9:261-269.

34. Sadekova S, Lehnert S, Chow TY. Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol.* 1997;6:653-660.
35. Aoki M, Morishita R, Matshushita H, et al. Serum deprivation-induced apoptosis accompanied by upregulation of p53 and bax in human aortic vascular smooth muscle cells. *Heart Vessels.* 1997;12:71-75.
36. George SJ, Angelini GD, Capogrossi MC, Baker AH. Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther.* 2001;8:668-676.
37. Wadhwa R, Takano S, Robert M, et al. Inactivation of tumor suppressor p53 by Mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem.* 1998;273:29586-29591.
38. Kaul SC, Reddel RR, Mitsui Y, Wadhwa R. An N-terminal region of mot-2 binds to p53 in vitro. *Neoplasia.* 2001;3:110-114.
39. Bennett MR, Macdonald K, Chan S-W, Boyle JJ, Weissberg PL. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 1998;82:704-712.
40. Bennett MR, Macdonald K, Chan S-W, Luzio JP, Simari R, Weissberg PL. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 1998;282:290-293.
41. Dimmeler S, Zeiher AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 2000;90:19-25.

42. Hsieh JK, Kletsas D, Clunn G, Hughes AD, Schachter M, Demoliou-Mason C. p53, p21(WAF1/CIP1), and MDM2 involvement in the proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:973-981.
43. Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J Vasc Surg.* 2000;31:567-576.
44. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res.* 1999;41:361-368.
45. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Brune B, Nicotera P. Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells. *Exp Cell Res.* 1994;213:172-177.
46. Geng Y, Wu Q, Muszynski M, Hansson G, Libby P. Apoptosis of vascular smooth-muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1-beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:19-27.
47. Aoki M, Morishita R, Matshushita H, et al. Inhibition of p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells. Potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension.* 1999;34:192-200.
48. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97:9390-9395.
49. Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 2001;19:946-951.

50. Wadhwa R, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Sugimoto Y, Mitsui Y, Kaul KC. Correlation between complementation group for immortality and the cellular distribution of mortalin. *Exp Cell Res.* 1995;216:101-106.
51. Takano S, Wadhwa R, Yoshii Y, Nose T, Kaul SC, Mitsui Y. Elevated levels of mortalin expression in human brain tumors. *Exp Cell Res.* 1997;237:38-45.
52. Rüdiger S, Freund SMV, Veprintsev DB, Fersht AR. CRINEPT-TROSY NMR reveals p53 core domain bound in an unfolded form to the chaperone Hsp90. *PNAS.* 2002;99:11085-11090.
53. Zylicz M, King FW, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor factor. *EMBO.* 2001;20:4634-4638.
54. King FW, Wawrzynow A, Hohfeld J, Zylicz M. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *EMBO J.* 2001;20:6297-6305.
55. Fusaro G, Wang S, Chellappan S. Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis. *Oncogene.* 2002, 21:4539-4548.

Figure 1 : Composite 2DE maps of soluble and membrane VSMC proteins showing changes in protein expression after the ouabain treatment

VSMC treated with 1 mM ouabain for 3 hours were extracted with buffer (*A*) and then with CHAPS detergent (*B*). Protein extracts were analysed by 2DE (electrofocusing in the pH range 3-10 followed by SDS PAGE on gradient 8-18% gels); the gels were stained with Coomassie Blue and compared using PDQuest software. Highlighted are protein spots that were changed 2-fold and more on all gels in the same series of gels. *Red* spots represent proteins induced by ouabain, *blue* spots, proteins suppressed by ouabain, *green* spots, proteins expressed at the same level in control and ouabain-treated cells. Identified proteins (1-24) are listed in Table. Images of representative Coomassie Blue stained gels are shown in the on-line supplement.

Inset: Enlarged fragments of 2DE gels showing the induction of mortalin (*red arrow, spot 2 on the composite gel*) and GRP78 (*blue arrow, spot 1 on the composite gel*) in ouabain-treated VSMC.

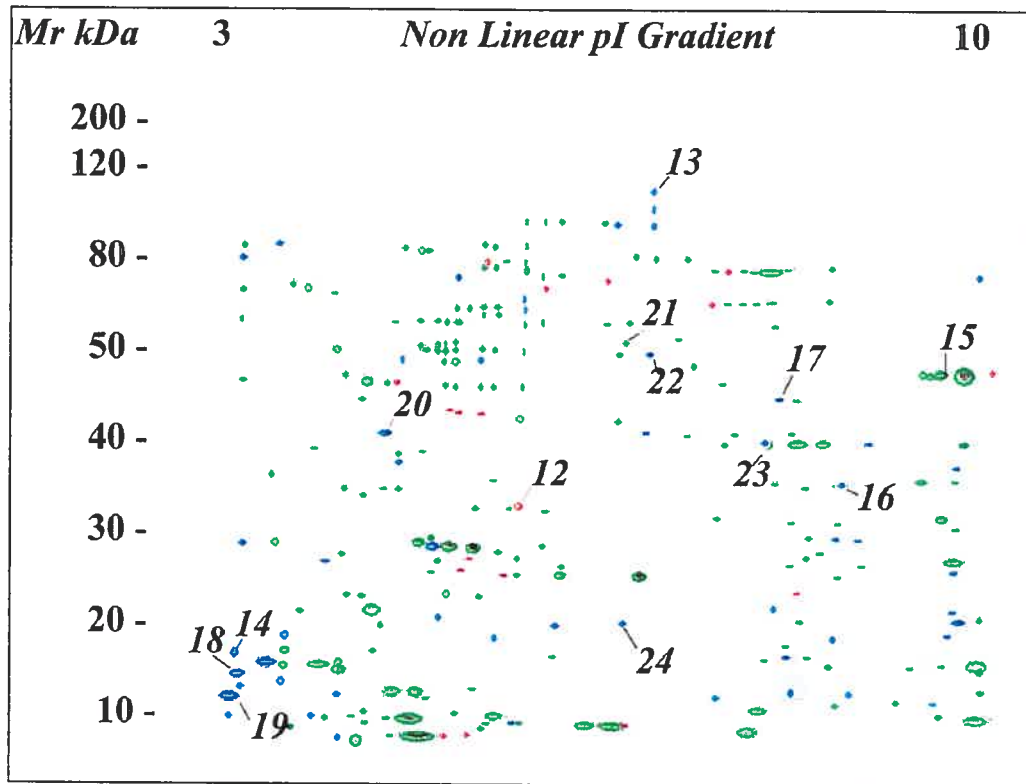
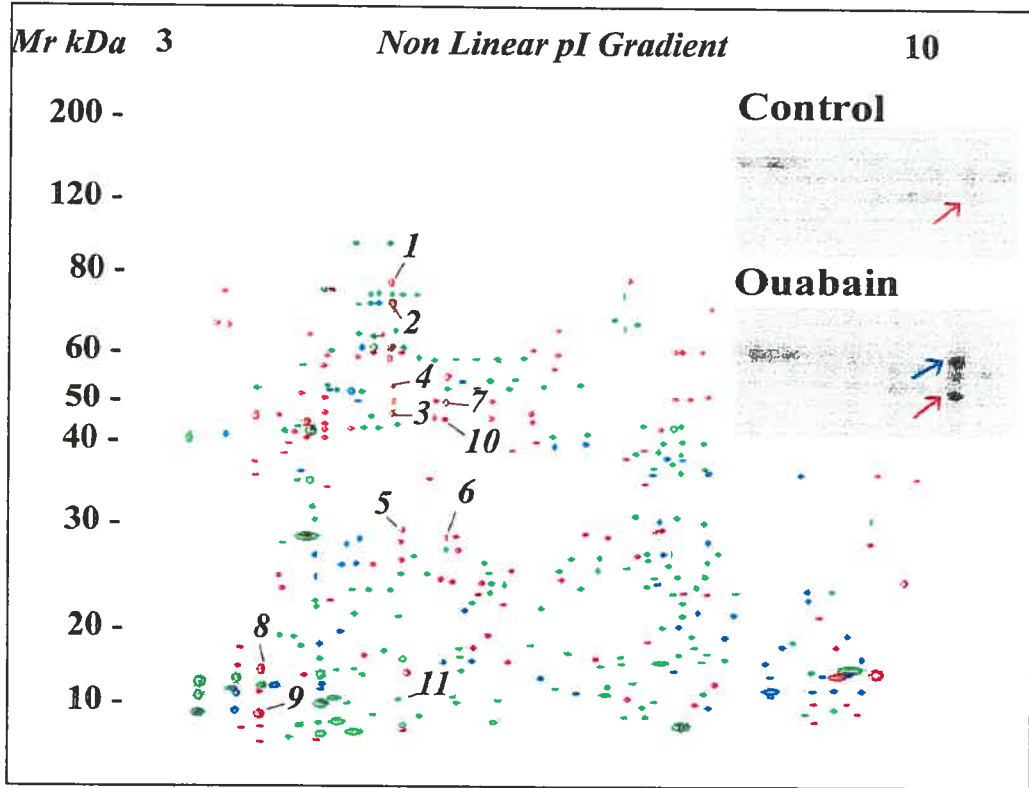


Figure 2 : Tandem mass spectra obtained from nanoLC-MS-MS analysis of mortalin (spot 2, table I).

Product ion scan of the doubly-protonated precursor ion m/z 616.4 (**A**) and product ion scan of m/z 785.0 (**B**). Collisional activation was obtained using Ar as a target gas at a collision energy (laboratory frame of reference) of 60 eV for (**A**) and 66 eV in (**B**).

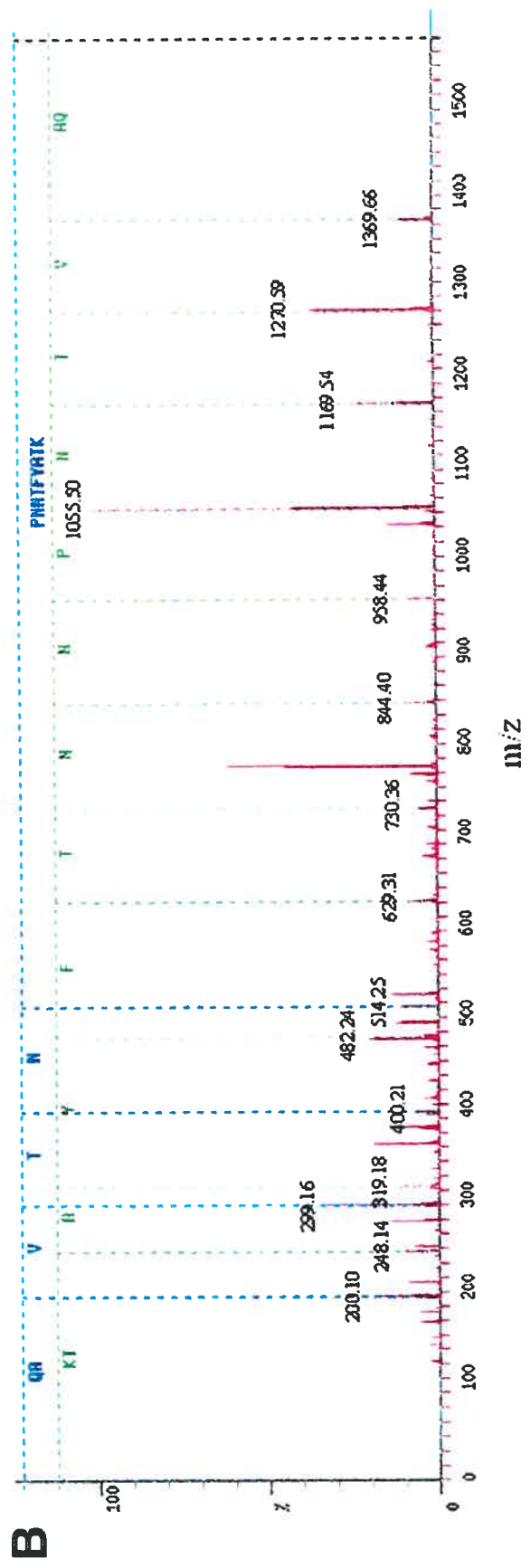
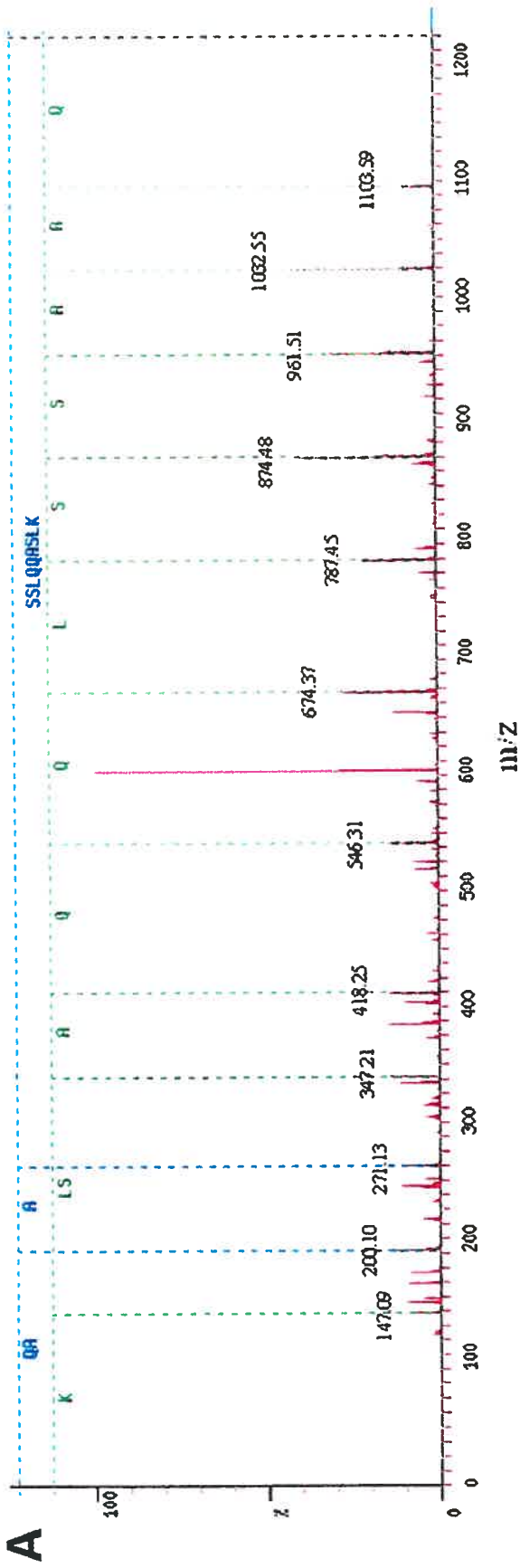


Figure 3 : Induction of mortalin in ouabain-treated VSMC

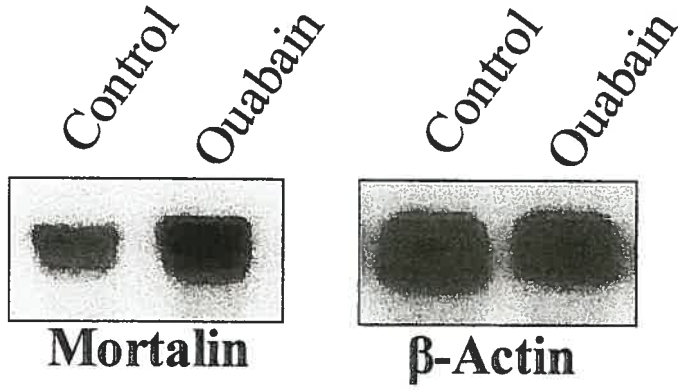
A. Northern blotting of RNA from control VSMC and the cells treated for 2 hours with 1 mM ouabain. The membranes were hybridised with ^[32]P-labelled *mortalin* and β -*actin* cDNA probes.

B. Western blotting of VSMC treated with 1 mM ouabain. At time intervals indicated on the figure the cells were lysed and 20 μ g aliquots of total VSMC protein were analysed by SDS-PAGE. The immunoblotting was performed with anti-mortalin mouse monoclonal antibodies.

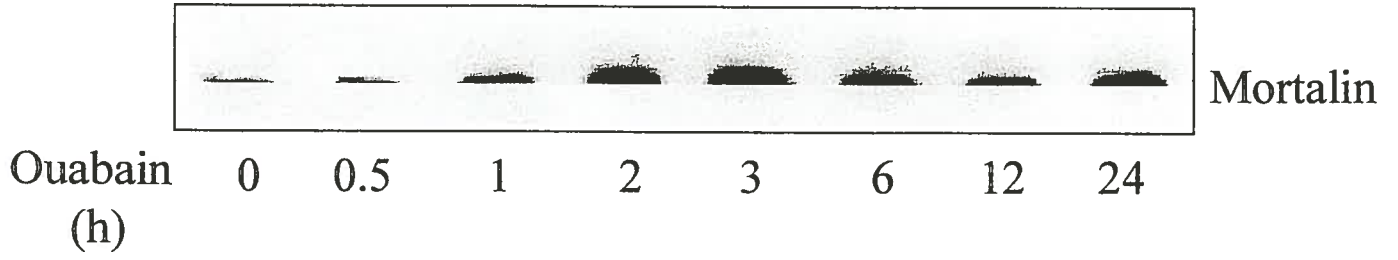
C. Immunohistochemical localization of mortalin in control and ouabain-treated VSMC. After 2-h incubation with 1 mM ouabain the cells were probed with mitochondrial marker, MitoFluor Red 594, fixed, stained with mouse monoclonal anti-mortalin antibodies, and counterstained with oregon green 488-conjugated secondary antibodies. Cell nuclei were visualized with DAPI. Slides were studied on a Zeiss LSM510 inverted confocal microscope. Magnification 600x



A



B



C

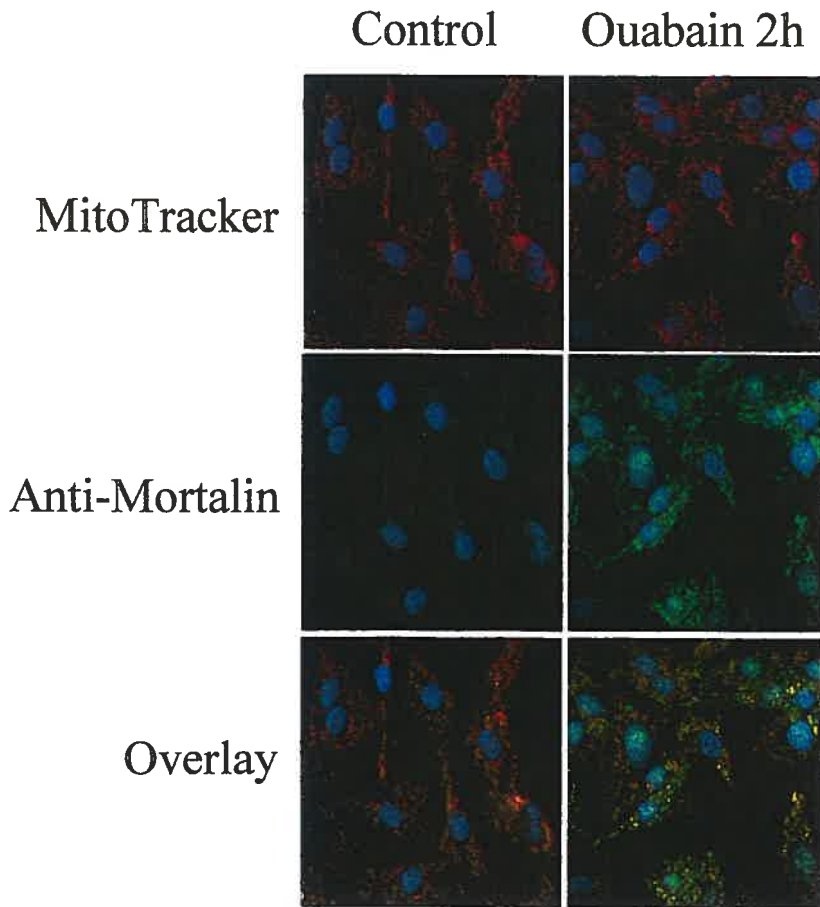


Figure 4 : Detection of mortalin in VSMC-E1A cells transfected with mortalin cDNA by western blot

Cells were transfected with different amounts of pCMV-SPORT-Mot vector and Effecten reagent as indicated on the figure. Forty-eight hours after transfection cells were lysed and 20 µg aliquots of total VSMC protein were analysed by SDS-PAGE. The immunoblotting was performed with anti-mortalin mouse monoclonal antibodies.

						Mortalin
pCMV-SPORT-Mot ($\mu\text{g/ml}$ of medium)	-	0.4	0.4	0.8		
Effecten ($\mu\text{l/ml}$ of medium)	10	10	20	20		

Figure 5 : Delay of apoptosis in VSMC-E1A cells transfected with mortalin cDNA

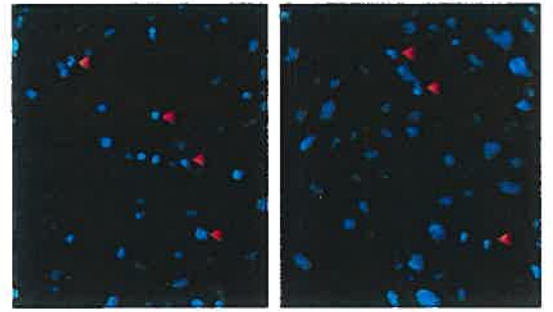
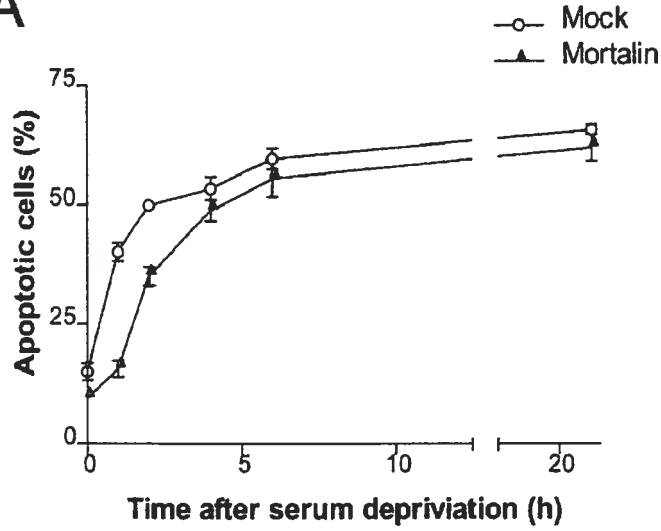
Forty-eight hours after transfection with pCMV-SPORT-Mot vector (*Mortalin*) or pCMV-SPORT vector (*Mock*) VSMC-E1A cells were incubated in CS-free medium with or without 1 mM ouabain. At time intervals indicated on the figures cells were fixed, stained with DAPI and a cumulative number of apoptotic deaths per 100 cells was counted either basing on chromatin condensation using epyfluorescent microscopy (*A*) or basing on cell morphology using phase contrast microscopy (*B*). *C* - after 2 hours in CS- free medium a portion of cells was harvested and their homogenates assayed for Caspase-3 activity as described (23). Values represent means \pm S.D. of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ as compared to mock-transfected cells.

Insets: *A* Epyfluorescent microscopy of DAPI-stained mortalin-transfected and mock-transfected VSMC-E1A cells 2 hours after serum deprivation. Arrowheads show condensed nuclei in apoptotic cells.

B Phase contrast microscopy of mortalin-transfected and mock-transfected VSMC-E1A cells 2 hours after serum deprivation. Arrowheads show apoptotic cells.

Magnification x 600.

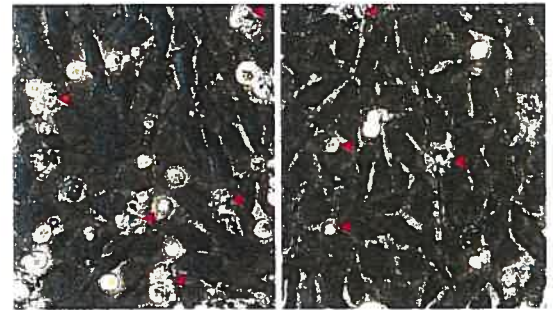
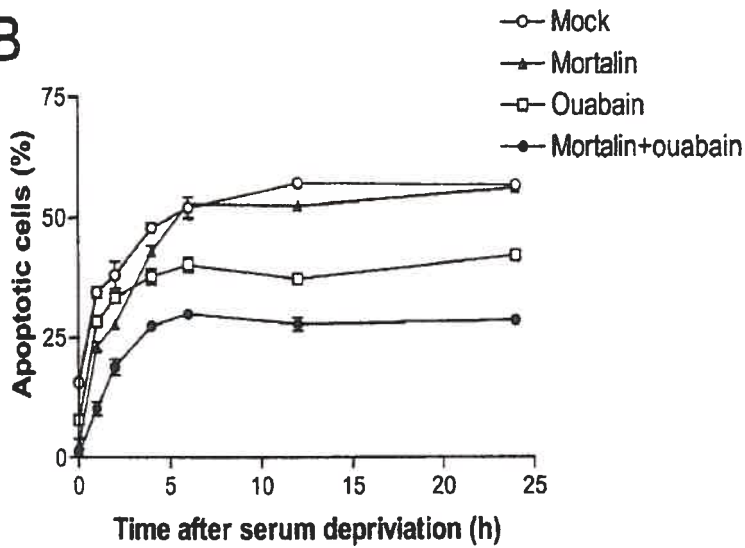
A



Mock

Mortalin

B



Mock

Mortalin

C

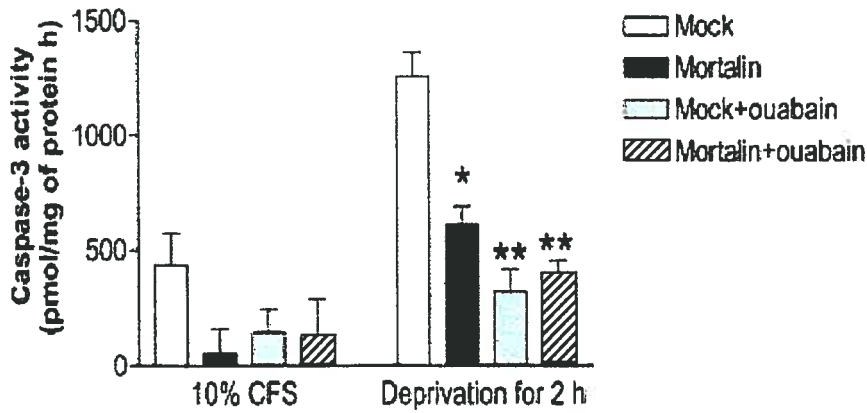


Figure 6 : Expression of p53 in mortalin-transfected VSMC

- A. Western blots of p53 in control and mortalin-transfected VSMC-E1A cells
- Forty-eight h after transfection with pCMV-SPORT-Mot vector (*Mortalin*) or with control pCMV-SPORT vector (*Mock*) VSMC-E1A cells were deprived from CS. At time intervals indicated on the figure cells were lysed and 20 μ g aliquots of total VSMC protein were analysed by SDS-PAGE. The immunoblotting was performed with anti-p53 mouse monoclonal antibodies. Position of p53 is shown on the right side of blot.
- B. Immunohistochemical localization of p53 in control and mortalin-transfected VSMC-E1A
- Forty-eight h after transfection with pCMV-SPORT-Mot vector (*Mortalin*) or empty pCMV-SPORT vector (*Mock*) VSMC-E1A cells were incubated in CS-free medium for 2 h, fixed and stained with mouse monoclonal anti-p53 antibodies. Left panels show p53-related immunofluorescence, right panels show merged fluorescent and phase contrast images. Arrowheads show apoptotic cells. Magnification x 1000.

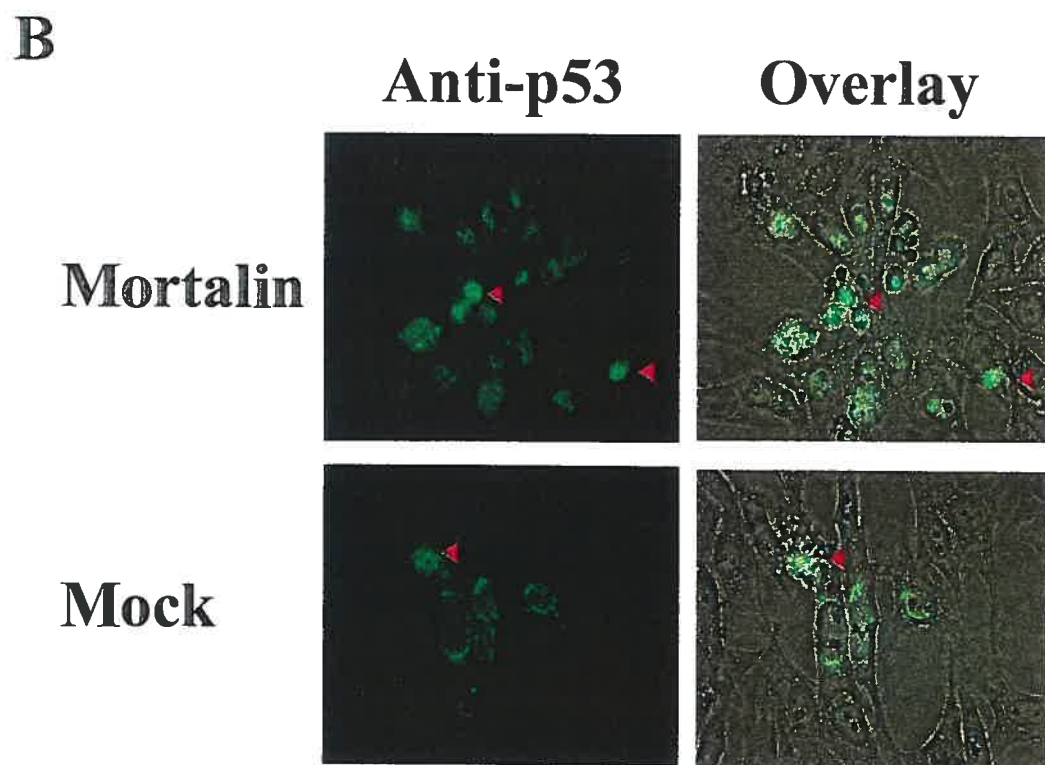
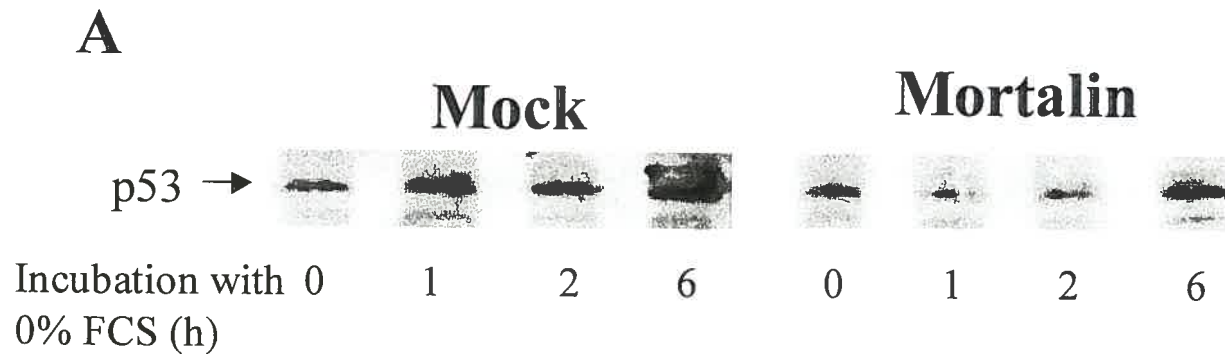


Table 1. VSMC proteins altered by ouabain treatment. O - “unmatched” protein spots detected only in ouabain-treated cells, C – spots detected only in control cells.

Induced proteins

Position on gel	Mr (kDa) pI		Identity	# peptide identified by MS-MS (seq. covered, %)	Accession number	Function ^a	Ouabain treated/Control ratio
	Experimental	Predicted					
1	72.3/5.4	72.3/5.1	78 kDa glucose regulated protein (BIP)	14 (25.8)	P20029	Ca ²⁺ -binding protein, involved in retention of unfolded proteins	O
2	69.7/5.4	73.8/5.1	Mitochondrial stress-70 protein (mortalin)	12 (23.5)	P48721	Chaperone, regulates cell proliferation and senescence	6.3
3	45.0/5.4	70.8/5.4	Health shock cognate 71 kDa protein (hsc71)	9 (16.0)	P08109	Chaperone, highly expressed in spermatogenic cells.	O
4	47.3/5.4	53.6/5.1	Vimentin	15(32.2)	P31000	Class III intermediate filaments in mesenchymal cells, actin assembly	O
5	28.4/5.5	53.6/5.1	Vimentin	13 (29.2)	P31000	Fragment	O
6	29.0/5.6	53.6/5.1	Vimentin	10 (20.0)	P31000	Fragment	O
7	47.1/5.6	41.7/5.3	Beta actin	10 (28.8)	P02570	Microfilament assembly	O
8	13.0/4.7	41.7/5.3	Beta actin	9 (26.0)	P02570	Fragment	O
9	8.3/5.4	16.8/4.1	Calmodulin	3 (27)	P02593	Universal Ca ²⁺ -binding protein, fragment	O
10	44.0/5.6	72.3/5.1	78 kDa glucose-regulated protein precursor (BIP)	5 (9.0)	P20029	Fragment	O
11	9.7/5.6	15.4/11.3	Histone H3.0	4 (22.0)	CAA56573	Nucleosome assembly	3.6
12	30.0/5.5	29.8/5.7	Prohibitin (B-cell receptor-associated protein)	10 (43.0)	P24142	Inhibits DNA synthesis and entry into S phase, mitochondrial chaperone	2

Suppressed proteins

Position on gel	Mr (kDa) pI		Identity	# peptide identified by MS-MS (seq. covered, %)	Accession number	Function	Ouabain treated/Control ratio
	Experimental	Predicted					
13	121.0/6.0	117.0/5.7	Vinculin	6 (5.0)	P18206	Involved in cell adhesion and actin attachment to the plasma membrane	C
14	16.0/4.6	16.8/4.5	Alkali myosin light chain I	4 (30.6)	NCBI 127151	Myosin catalytic light chain, controls VSMC contraction	C
15	49.0/7.6	46.5/8.6	47 kDa heat shock protein, GP46	13 (34.3)	P29457	Collagene-specific chaperon	0.5
16	32.0/7.0	38.6/7.5	Annexin I (lipocortin I)	7 (22.6)	P07150	Ca ²⁺ /acid phospholipid-binding protein, involved in exocytosis and regulation of PLA2 activity	0.26
17	44.0/6.7	41.7/7.3	α 2-macroglobulin receptor-associated protein	9 (26.6)	Q99068	Interacts with α 2-macroglobulin receptors	C
18	14/<4.5	13.8/10.7	Histone H2b	5 (41.0)	Q00715	Protein of the nucleosome	C
19	14/<4.5	11.2/11.7	Histone H4	6 (42.0)	P02304	Protein of the nucleosome	0.59
20	38.0/5.0	32.5/4.6	Nucleophosmin	3 (13.3)	P13084	Binds single-stranded nucleic acids, subjected to cell cycle-dependent phosphorylation	C
21	55.0/6.1	54.3/6.1	Aldehyde dehydrogenase mitochondrial, rat	4 (8.0)	P11884	Converts aldehydes to acids	0.27
22	53.0/6.0	49.9/6.5	α -Enolase	8 (22.6)	P04764	Glycolytic enzyme	0.77
23	35.6/8.7	35.7/8.5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9 (32.5)	P04797	Glycolytic enzyme	0.67
24	20/5.9	17.2/6.0	CDNA FLJ14844 fis* clone PLACE1000133, human	2 (5.0)	Q96K17	Function unknown	C

^aMain references used to determine protein function are provided in the on-line supplement.

Résumé

Les études précédentes ont démontré qu'une élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ dans des CMLV incubées en présence de ouabaïne ou dans un milieu dépourvu de K^+ , inhibe de façon transitoire le développement du processus apoptotique provoqué par déprivation en sérum. Cette inhibition de l'apoptose par la ouabaïne est complètement abolie par les inhibiteurs de la synthèse d'ARN et des protéines.

L'article présenté dans cette thèse a permis d'identifier plusieurs protéines dont l'expression est altérée par une élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle du profil protéique des cellules traitées à la ouabaïne démontre que celle-ci modifie l'expression d'un grand nombre de protéines solubles. Parmi ces protéines, notre intérêt s'est porté sur la mortaline (également appelée GRP75 ou PBP74). La mortaline appartient à la famille des protéines de choc thermique de 70 kDa (HSP70), les analyses par Western blot, Northern blot et immunocytochimie démontrent une activation de son expression en présence de ouabaïne. Une transfection transitoire de CMLV avec l'ADNc codant pour la mortaline d'origine humaine permet d'observer un retard de 6 h dans le développement de l'apoptose après la déprivation de sérum ainsi qu'une diminution d'environ deux fois de l'activité de la caspase-3 après 2 h d'incubation. Dans ces cellules transfectées, l'expression de la protéine p53 est également retardée de 6 h et des analyses par immunocytochimie démontrent que la localisation de la protéine p53 est périnucléaire plutôt que nucléaire. Ces données suggèrent que p53 est retenue et inactivée au niveau du cytoplasme par la mortaline. D'autre part, d'autres protéines identifiées au cours de cette étude telles que la protéine Hsc70 et la nucléophosmine confirment le rôle essentiel de la mortaline dans l'inactivation de la protéine p53.

Toutefois, cet effet de la mortaline est plus limité dans son efficacité et dans le temps que celui de la ouabaïne suggérant que l'induction de la mortaline est seulement l'un des éléments qui participe à l'inhibition du processus apoptotique provoqué par une élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$.

Ces données permettent de définir une nouvelle voie de signalisation sensible à une élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ et qui pourrait de jouer un rôle important dans la régulation de l'apoptose des CMLV.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

5.1 Inhibition de l'apoptose par la voie de signalisation de l'AMPC et par l'élévation du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$: preuve de deux voies distinctes.

Les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de l'apoptose apparaissent spécifiques à chaque tissu. Ainsi, dans les neutrophiles (316), les cellules endothéliales (326), les cellules neuronales (118) et les hépatocytes (232, 424), l'AMPC bloque le développement du processus apoptotique. En revanche dans les lymphocytes T, l'AMPC n'a aucun effet anti-apoptotique (366) et il stimule l'apoptose dans les thymocytes (386). Les travaux réalisés par le Dr Orlov et ses collaborateurs ont permis d'observer qu'une activation de la voie de l'AMPC par la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, inhibe de façon transitoire l'apoptose induite par la déprivation de sérum des CMLV (305). Cette activité anti-apoptotique dans les CMLV correspond à la cinétique de production de l'AMPC et d'activation de la protéine kinase A (PKA), l'inhibition de l'apoptose par la forskoline étant diminuée par la présence d'inhibiteurs de la PKA (305). Ces travaux ont également permis de déterminer que cet effet est indépendant d'une réorganisation du cytosquelette induit par l'AMPC, d'une activation des MAP kinases (ERK1/2) et qu'il se réalise en amont de l'activation de la caspase-3 (305).

De plus, l'inhibition de l'apoptose par l'activation de la voie de signalisation dépendante de l'AMPC s'accompagne d'une légère augmentation de la synthèse d'ARN d'environ 1,6 fois après 2 h d'incubation en présence de forskoline (tableau I, page 81). L'addition d'un inhibiteur de la synthèse d'ARN, l'actinomycine D, abolit l'effet de la forskoline. En revanche ni l'actinomycine D, ni la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique ne sont en mesure d'affecter l'inhibition de l'apoptose (Tableau II, page 82 et tableau III, page 83). De façon similaire, les études précédentes réalisées dans les laboratoires du Dr Orlov et du Dr Hamet ont pu démontrer que l'inversion du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ par l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaine ou un milieu dépourvu en K^+ bloque de façon transitoire l'apoptose en amont de l'activation de la caspase-3 dans les CMLV de rat (306). Cette inhibition s'accompagne d'une activation de la synthèse d'ADN et d'ARN sans activation de la synthèse protéique (voir annexe I) (303, 304). Nos études nous ont permis de conclure que cette inhibition du processus apoptotique

est toutefois abolie par les inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de protéines (voir annexe II) démontrant ainsi une stricte dépendance vis à vis de la synthèse *de novo* de protéines (303).

Ces résultats suggèrent que l'effet anti-apoptotique de l'AMPC ne dépend pas de l'expression de gènes codant pour un inhibiteur du processus apoptotique, mais semble impliquer la phosphorylation de protéines existantes par l'intermédiaire de la PKA. En revanche, l'inhibition de l'apoptose via l'inactivation de la Na^+ , K^+ -ATPase se réalise par l'activation d'éléments sensibles à l'élévation du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$; éléments qui sont par la suite responsables de l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose. Enfin, notre projet s'est intéressé à l'étude des mécanismes de l'induction massive de la synthèse d'ARN et à l'identification des gènes anti-apoptotiques dont l'expression est affectée par la ouabaïne.

5.2 Expression de la protéine c-Fos et preuve de l'existence d'un élément sensible au Na^+

Afin d'identifier les éléments sensibles à une inactivation de la Na^+ , K^+ -ATPase et capables d'influencer l'expression de protéines anti-apoptotiques, nous avons observé les effets de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase sur l'expression des plusieurs gènes de réponse primaire (GRP). Ces GRPs sont comme des éléments intermédiaires entre la synthèse massive d'ARNm observée dans les CLMV traitées à la ouabaïne, et l'inhibition vis à vis de l'apoptose induite par une déprivation en sérum (303, 304).

Les premières expériences ont permis de mettre en évidence un effet de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase sur l'expression des protéines c-Fos et c-Jun (figure 1, page 113). L'induction de la protéine c-Fos est rapide : une augmentation de six fois après 2h d'incubation, puis un retour au niveau basal après 24 h, alors que celle de la protéine c-Jun est plus lente, une élévation de quatre fois après 12 h d'incubation et son expression demeure élevée au delà de 24 h (figure 1B, page 113). En considérant que l'induction de l'apoptose dans les cellules non traitées à la ouabaïne se réalise relativement tôt après la déprivation en sérum, l'étude s'est uniquement consacrée aux mécanismes d'activation de l'expression de la protéine c-Fos.

Ces études démontrent que l'induction de c-Fos par la ouabaïne est dépendante de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase plutôt que de son interaction avec d'autres cibles cellulaires. La figure 2 (page 115) montre une forte élévation de l'expression de c-Fos dans un milieu dépourvu de K^+ . Les concentrations en ouabaïne inférieures à $100 \mu\text{M}$, incapables de perturber le rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, n'ont aucun effet sur l'activation de l'expression de la protéine c-Fos (figure 3, page 117). A une concentration en ouabaïne de $100 \mu\text{M}$, l'activité maximale de la Na^+ , K^+ -ATPase est inhibée à 50%, toutefois en raison de la rétro-activation de la NaK ATPase, le rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ n'est pas altéré (399). En revanche, les concentrations en ouabaïne supérieures à $500 \mu\text{M}$ altèrent le rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ et influencent également l'expression de la protéine c-Fos (figure 3, page 117). Ces données suggèrent que la ouabaïne provoque une augmentation de l'expression de c-Fos via l'élévation du rapport $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ plutôt qu'une dépolarisation ou un changement de conformation indépendant du flux ionique de la Na^+ , K^+ -ATPase.

L'expression de l'ARNm de c-Fos augmente après 10 min d'incubation et est augmenté de 4 fois après 30 min d'incubation. L'analyse du contenu intracellulaire en Na^+ et K^+ à cet instant démontre que la ouabaïne n'a aucun effet sur la $[\text{K}^+]_i$, en revanche la $[\text{Na}^+]_i$ est augmentée de 4 fois (figure 4, page 119). Le potentiel membranaire des CMLV au repos se situe entre -50mV et -60mV et est plus proche du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ($E_{\text{K}} = -87\text{mV}$) que du potentiel d'équilibre de l'ion Na^+ ($E_{\text{Na}} = +60 \text{mV}$), l'état de repos est principalement dû à la perméabilité de la membrane aux ions K^+ . L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase, durant la première heure, provoque une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ sans affecter la $[\text{K}^+]_i$, les ions Na^+ entrant par diffusion. Ces données démontrent que l'élévation de la $[\text{Na}^+]_i$ plutôt que la diminution de la $[\text{K}^+]_i$ est déterminante dans l'induction de la protéine c-Fos dans les CMLV traitées à la ouabaïne.

L'augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ peut affecter plusieurs processus de régulation cellulaire tels que le pH intracellulaire (pHi) et la concentration intracellulaire en calcium libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) par l'activation des échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Cette augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$ peut également perturber le contenu total des osmolytes et ainsi modifier le volume cellulaire (figure 1, page 176). L'étude de l'influence de la ouabaïne sur chacun de ces paramètres n'a pas permis d'établir leur implication dans l'activation de l'expression de la protéine c-Fos dans les CMLV. En fait, le traitement des CLMV par 1mM ouabaïne

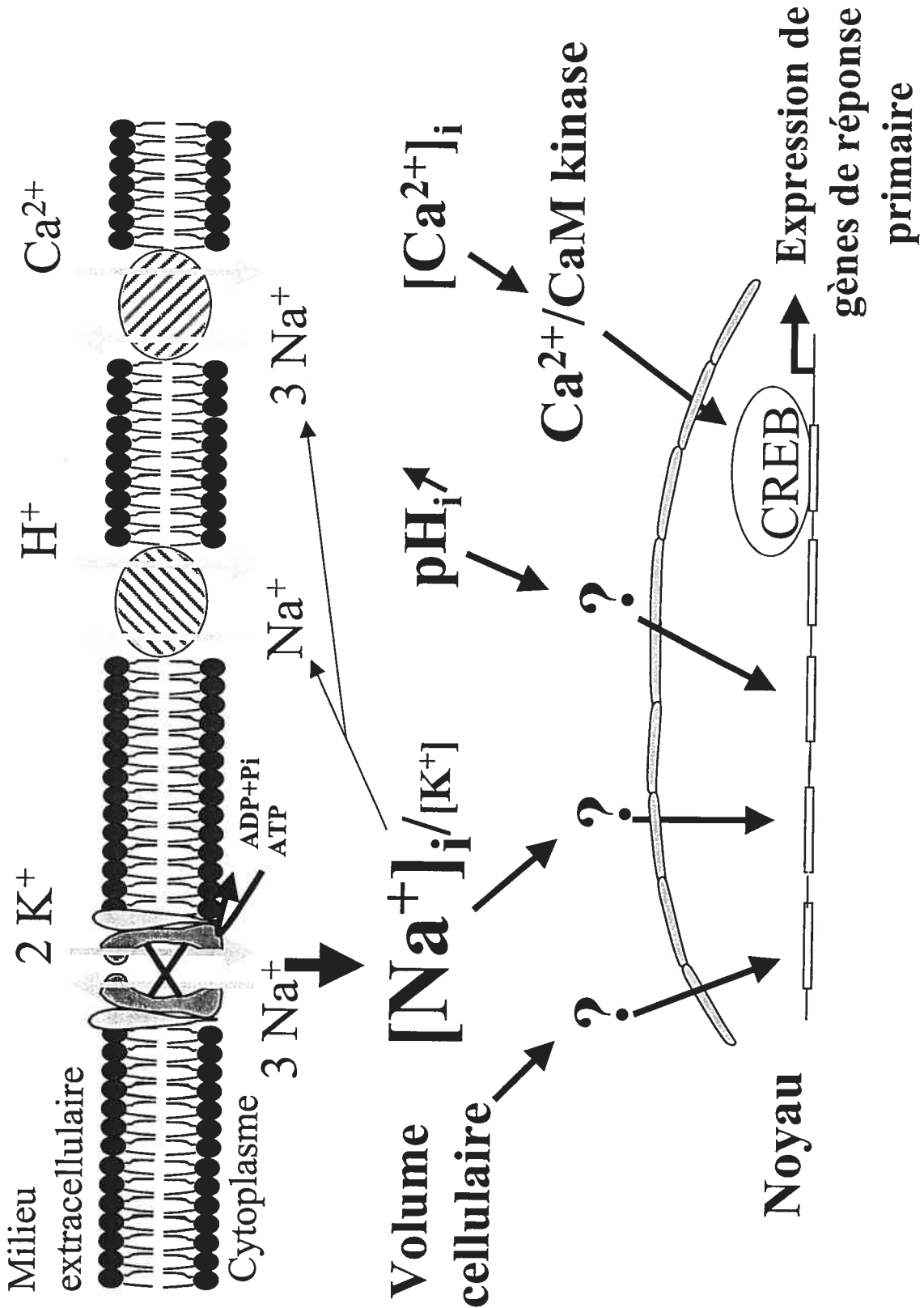


Figure 1: Implications potentielles d'une augmentation de la $[Na^+]_i$ sur l'expression de *c-fos*

pendant 1h n'affecte pas le pH_i (celui-ci a une valeur de $7,11 \pm 0,14$ dans les cellules contrôles alors que dans les cellules traitées à la ouabaïne le pH_i équivaut à $7,09 \pm 0,12$), ces résultats s'accordent avec le mode d'opération Na^+/Na^+ du transporteur Na^+/H^+ observé dans des études précédentes (298). En revanche, l'incubation des CMLV en présence de ouabaïne diminue de façon transitoire le volume des CMLV (16% après 2h d'incubation avec la ouabaïne, figure 5, page 121). Une diminution équivalente du volume cellulaire est obtenue en présence de mannitol 100 mM, un osmolyte imperméable, et une diminution plus prononcée en présence de mannitol 300mM. Toutefois chacune de ces concentrations en mannitol n'a aucun effet sur l'expression basale de la protéine c-Fos. Ces résultats excluent l'implication du pH_i ou d'une altération du volume cellulaire dans l'activation de la protéine c-Fos dans les CMLV traitées à la ouabaïne.

Des travaux réalisés précédemment ont démontré l'implication de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans l'activation de l'expression de la protéine c-Fos dans des cardiomyocytes néonataux (321). Une activation de l'expression de c-Fos par l'intermédiaire des canaux calciques de type L est observée lors de la dépolarisation des CMLV dans un milieu d'incubation riche en K^+ (figure 6, page 123). La dépolarisation membranaire s'accompagne d'une activation des canaux calciques de type L suivie d'une entrée massive de Ca^{2+} , supérieure d'environ 2,5 fois à celle rencontrée dans les cellules non traitées à la ouabaïne, et responsable de l'activation de l'expression de c-Fos. Cette induction de l'expression de c-Fos est complètement abolie par la nifédipine, un inhibiteur des canaux calciques de type L, ce qui est en accord avec les données obtenues précédemment (308). Toutefois, cet inhibiteur ne produit aucun effet sur l'expression de c-Fos dans les CMLV traitées à la ouabaïne, ces résultats excluant l'implication de ces canaux calciques. La ouabaïne n'a également aucun effet mobilisateur du Ca^{2+} intracellulaire dans ces cellules (figure 7 A-D, page 125), aussi bien au niveau de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre que du contenu total du Ca^{2+} échangeable (figure 7E, page 125). Contrairement à ce qui a été observé dans les cardiomyocytes néonataux (321), le retrait du milieu extracellulaire du Ca^{2+} , ou l'utilisation de chélateurs calciques extracellulaire (EGTA) ou intracellulaire (BAPTA) n'influencent pas l'activation de l'expression de c-Fos induite par la ouabaïne dans les CMLV (figure 8, page 127). Ces résultats excluent également le Ca^{2+} comme élément intermédiaire entre l'inhibition de la

Na^+ , K^+ -ATPase et l'induction de l'expression de c-Fos dans les CMLV traitées à la ouabaïne.

La figure 8 (page 127) montre que l'addition d'un chélateur calcique extracellulaire, EGTA, active l'expression basale de c-Fos. Les expériences précédentes faites par le Dr Orlov indiquent que lors de l'incubation des CMLV en présence EIPA, de bumétanide et de ouabaïne, l'addition d'EGTA dans ce milieu provoque une augmentation de 4 fois du flux sodique vers l'intérieur de la cellule. Le mécanisme de ce phénomène reste inconnu ; toutefois, on peut supposer que l'augmentation de l'expression basale de c-Fos observée en présence d'EGTA est essentiellement due à une augmentation de la $[\text{Na}^+]_i$. Cette contradiction avec les cardiomyocytes peut s'expliquer par l'abondance dans ces cellules de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui lors d'une élévation de la $[\text{Na}^+]_i$ est activé et permet un influx de Ca^{2+} et/ou une diminution de l'efflux du Ca^{2+} dans les cellules, une mobilisation des réserves calciques du réticulum endoplasmique/ sarcoplasmique puis l'activation de l'expression d'un certain nombre de protéines (figure 1, page 176) (43).

Ces résultats diffèrent également de ceux obtenus par différents laboratoires travaillant à partir de cultures primaires de CMLV ou des portions d'aorte fraîchement isolée dans lesquelles l'élévation de la $[\text{Na}^+]_i$ aboutit à une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (43). La nature de l'inactivation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dans nos cellules soumises à plus de 10 passages demeure inconnue. Néanmoins, les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne ou un milieu d'incubation dépourvu de K^+ , active l'expression de la protéine c-Fos par l'intermédiaire d'un processus sensible à la $[\text{Na}^+]_i$ mais indépendant de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ce mécanisme peut être défini comme un couplage excitation/transcription dépendant de la $[\text{Na}^+]_i$ et indépendant de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase affecte les voies de signalisation MAPK, JNK, p38 et CaM kinase de façon spécifique au type cellulaire et selon l'espèce considéré (Tableau V, page 54). Toutefois, la recherche des éléments participants à l'expression de la protéine c-Fos dans les CMLV traitées à la ouabaïne suggère que ceux-ci sont indépendants de l'activation des MAPK, JNK et p38 kinases et vraisemblablement des kinases dépendantes du Ca^{2+} . Les résultats obtenus montrent également que l'effet de la ouabaïne sur l'expression de c-Fos est additif à celui du sérum (figure 10, page 131), suggérant que ces deux effets emploient deux voies

distinctes d'activation et donc des éléments de réponse différents sur le promoteur du gène *c-fos*. Muto et ses collaborateurs ont également rapporté que l'accumulation de l'ARNm des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la Na^+ , K^+ -ATPase, dans les cellules épithéliales de rein de rat traitées à la ouabaïne, est indépendante d'une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, d'une diminution du pH_i et semble impliquer directement la $[\text{Na}^+]_i$ (284). Toutefois la cinétique de la modulation de la $[\text{K}^+]_i$ par la ouabaïne n'a pas été étudiée. De plus, il n'y a aucune comparaison avec l'effet d'un milieu dépourvu en K^+ ou avec l'effet de la ouabaïne dans un milieu dépourvu en Na^+ pour montrer que cette action est transmise par des flux ioniques plutôt que par des changements de conformation de la Na^+ , K^+ -ATPase induits par la ouabaïne.

Le promoteur de *c-fos* se compose de trois éléments de réponse majeurs qui contrôlent l'expression basale de *c-fos* : l'élément de réponse au sérum (SRE) qui interagit avec un complexe ternaire composé du facteur de réponse au sérum (SRF) et d'un facteur de croissance Elk-1 ; l'élément de réponse au Ca^{2+} /AMPc (CRE) interagissant avec une protéine de liaison au CRE et l'élément AP-1 qui lie l'hétérodimère AP-1 composé des protéines c-Fos/c-Jun ou c-Jun/c-Jun ; enfin d'autres éléments inductifs participent également, comme la région riche en nucléotides G et C qui interagit avec un facteur nucléaire et l'élément de liaison au facteur nucléaire-1 (NF-1) interagissant avec sa protéine de liaison (NF-1 BP) (figure 2, page 179).

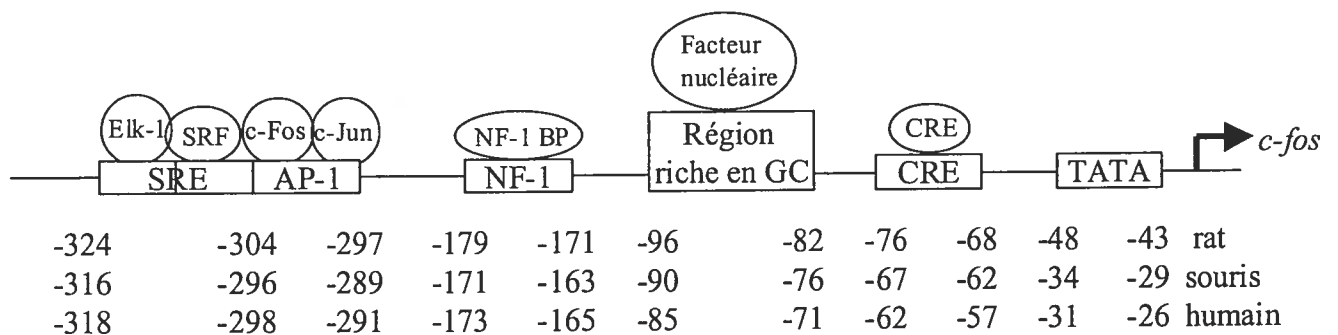


Figure 2 : Représentation schématique de la structure du promoteur de *c-fos* et position de ces éléments par rapport au site d'initiation de la traduction chez la souris, le rat et l'humain.

Toutefois, aucun de ces éléments n'est activé lors de l'incubation des CMLV en présence de 1mM de ouabaine (figure 7, page 125 et tableau 1, page 133) suggérant l'existence d'un élément sensible à une élévation de la $[Na^+]_i$ et qui interagit avec des facteurs distincts de ceux impliqués dans le contrôle de l'expression basale de *c-fos*. Plusieurs travaux ont permis de définir une région sensible à une élévation de la $[Na^+]_i$ dans le promoteur de *c-fos*, mais également dans les promoteurs des gènes codant pour la sous-unité $\alpha 1$ et la sous-unité $\beta 1$ de la Na^+, K^+ -ATPase. L'identification de cet élément sensible à une élévation de la $[Na^+]_i$ est l'une des perspectives de développement de ce projet de recherche.

5.3 Protéines dont l'expression est modifiée par l'inhibition de la Na^+, K^+ -ATPase

La dernière partie de cette thèse présente des études réalisées par électrophorèse bidimensionnelle. Les études préliminaires utilisant un marquage métabolique des protéines à la méthionine ^{35}S ont permis d'observer que l'incubation des CMLV pendant 3 h dans un milieu dépourvu de sérum, et en présence de ouabaine, conduit à la synthèse *de novo* d'un grand nombre de protéines (voir annexe III). Ces expériences démontrent que le protéome des CMLV change en réponse à un traitement à la ouabaine. De plus, afin d'améliorer la sensibilité de la détection, les protéines ont été séquentiellement extraites en deux fractions : la première fraction correspondant aux protéines solubles et la seconde regroupant les protéines hydrophobiques.

Les changements les plus significatifs sont rencontrés dans la fraction des protéines solubles (figure 1 AB, page 156). Plusieurs protéines dont l'expression est modifiée par l'inhibition de l'activité de la Na^+, K^+ -ATPase ont été collectées et identifiées par spectrométrie de masse (tableau I, page 168). Plusieurs protéines chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique telles que la protéine de 78 kDa régulée par le glucose (GRP78), la mortaline et un fragment de 45 kDa de la protéine Hsc70, sont augmentées, alors qu'une autre chaperonne, la protéine Hsp47 voit sa quantité diminuée en présence de ouabaine. Les différentes études réalisées sur l'implication de ces protéines dans les processus apoptotiques permettent plusieurs interprétations. Chez les Eucaryotes,

le système Hsc 70/Hsp70 avec la co-chaperonne Hsp40 participe au repliement d'une grande variété de protéines (353). Des études récentes montrent que Hsc70 et Hsp40 suppriment l'oligomérisation de la protéine p53 dans le cytoplasme (445). Ce complexe est déplacé par la protéine Hsp90 qui participe à l'importation de la protéine p53 dans le noyau cellulaire (445). Ce complexe Hsp90-p53 peut être sélectivement dissocié par la protéine Bag-1 qui permet la libération de la protéine p53, rendant la protéine p53 susceptible à la protéolyse (208). Le clivage de la protéine Hsc70 en un fragment de 45 kDa observé dans les cellules traitées à la ouabaïne, peut être interprété comme le résultat de la dégradation et de l'inactivation de la protéine Hsc70, favorisant la séquestration cytoplasmique de la protéine p53 et l'inhibition de l'apoptose. D'autres études montrent également l'importance de Hsc70 et Hsp40 dans la stabilisation de la conformation de la DNase activée par les caspases (CAD). La CAD est responsable de la fragmentation de l'ADN chromosomique lors de l'apoptose (95). Dans les cellules en prolifération, CAD existe sous la forme d'un complexe avec un inhibiteur de la CAD (ICAD). Lorsque ICAD est clivé par les caspases, la libération de CAD permet la fragmentation de l'ADN (352). En l'absence de Hsc70 et Hsp40, CAD est dénaturée, agrégée et inactive (353).

Une autre protéine dont l'expression est diminuée lors du traitement des CMLV par la ouabaïne peut participer à cette réponse anti-apoptotique. La nucléophosmine est une protéine multifonctionnelle qui semble impliquée dans la biogénèse des ribosomes (163, 293), la diminution de la synthèse protéique observée dans les cellules traitées à la ouabaïne peut en partie résulter d'une diminution de la synthèse des ribosomes. Cette protéine stimule également l'importation nucléaire de protéines en agissant comme chaperonne (49, 393, 394). Cette dernière activité est particulièrement intéressante en considérant que la nucléophosmine interagit avec la protéine p53 et semble stabiliser et réguler directement l'activité de p53 ainsi que son activation transcriptionnelle (74). La nucléophosmine semble également fonctionner comme une chaperonne moléculaire pour p53, en empêchant son aggrégation ou en régulant son transport et sa localisation cellulaire (74). La diminution de la nucléophosmine dans les cellules traitées à la ouabaïne peut en partie expliquer la diminution de l'ARNm de p53 et également contribuer à la localisation cytoplasmique de la protéine p53 observée dans les CMLV surexprimant la mortaline.

L'expression de la protéine chaperonne GRP78 est remarquablement augmentée en réponse à l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne. GRP78 semble impliquée dans l'adoption d'une conformation appropriée et de l'assemblage des protéines lors de leur maturation (223). Son expression est augmentée en réponse à différents stress spécifiques à chaque type cellulaire (269). L'un des rôles de GRP78 est associé au contrôle de la traduction de l'ARNm. L'induction ou la surexpression de la GRP78 confère une tolérance à l'inhibition de la traduction par la phosphorylation de la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique (eIF2) via une kinase du facteur eIF2 comme la kinase pancréatique du facteur eIF2 (PEK). Le facteur eIF-2, combiné à l'ARNt-méthionyl initiateur et au GTP, s'associe à la sous-unité ribosomale 40S et participe à la reconnaissance du codon de départ lors de l'initiation de la traduction. Durant l'assemblage des sous-unités ribosomiques 40S et 60S, le GTP complexé à eIF2 est hydrolysé en GDP. La phosphorylation de eIF2 par PEK réduit l'échange entre eIF2-GDP et eIF2-GTP catalysé par le facteur eIF2B. La diminution des niveaux de eIF2-GTP empêche l'initiation de la traduction dans les cellules (247). Dans des conditions normales, PEK est associée à GRP78 et GRP94, alors que dans des conditions de stress une interaction minimale est détectée entre GRP78 et PEK. GRP78 agit par répression de l'activité de la PEK. GRP78 pourrait être responsable dans un premier temps de la libération de PEK, de la phosphorylation de eIF2 et enfin d'une diminution de la synthèse protéique observée dans les CMLV traitées pendant 2 h à la ouabaïne (303). Ensuite l'induction de l'expression de GRP78 faciliterait la traduction des ARNms et le retour à un niveau basal de l'expression protéique observé dans les CMLV après 24 h d'incubation avec la ouabaïne (303), en exerçant une répression de l'activité de la PEK (247).

La prohibitine est une autre protéine dont l'expression est augmentée après traitement des CMLV avec la ouabaïne. La prohibitine est codée par un gène potentiellement tumeur-suppresseur, provoquant l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la transition des phases G1/S (176, 72). Cette observation est particulièrement intéressante puisque l'analyse du cycle cellulaire des CMLV traitées à la ouabaïne démontre une forte proportion de cellules en phase G1, révélant un blocage de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire des CMLV (304). La prohibitine est capable d'interagir avec toutes les protéines membres de la famille des rétinoblastomes (Rb) qui répriment l'activité transcriptionnelle des

facteurs de transcription E2F (421). Cette famille de facteurs de transcription E2F joue un rôle significatif dans la progression du cycle cellulaire chez les mammifères et est impliquée dans la différenciation cellulaire et l'apoptose (221, 190, 340, 385). Des études récentes suggèrent également que la prohibitine interagit physiquement avec E2F dans une région distincte de la protéine Rb et régule la fonction de E2F. La prohibitine agit probablement comme un lien entre certaines voies de signalisation spécifiques et la machinerie du cycle cellulaire. Le mécanisme de répression de l'activité transcriptionnelle n'est pas encore bien défini, néanmoins la prohibitine permettrait de recruter d'autres corépresseurs et agirait ainsi comme adaptateur (422, 423).

5.4 La mortaline, gène anti-apoptotique

Parmi les protéines identifiées par spectrométrie de masse, notre étude s'est particulièrement intéressée à la mortaline. Cette protéine est également appelée protéine régulée par le glucose de 75 kDa (GRP75) ou protéine liant les peptides de 74 kDa (PBP74) ou encore protéine mitochondriale du stress de 70 kDa. La mortaline appartient à la famille des protéines de choc thermique de 70 kDa, la structure simplifiée de ces protéines est illustrée sur la figure 3 (page 184). La famille des protéines de choc thermique (HSP) est essentielle pour un certain nombre de fonctions cellulaires. Elles sont essentielles comme chaperonnes moléculaires, elles participent à la sécrétion des protéines, la transduction des signaux, le marquage des protéines pour leur dégradation, et elles sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (413, 122, 277). Elles sont exprimées de manière constitutive ou inductible. Parmi celles-ci, la mortaline est exprimée de façon constitutive et inductible, elle participe au repliement et au transport des protéines, au contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (413, 202, 416). La mortaline existe sous deux isoformes qui diffèrent chez la souris par deux acides aminés dans la région C-terminale de la protéine (201), mais dont la détermination chez le rat et l'humain dépend de modifications protéiques encore indéterminées ou de la présence de co-facteurs (416). Ces deux protéines diffèrent par leur distribution cellulaire : la mortaline-1 (mot-1) est pancytosolique alors que la mortaline-2 (mot-2) est périnucléaire, mitochondriale, et

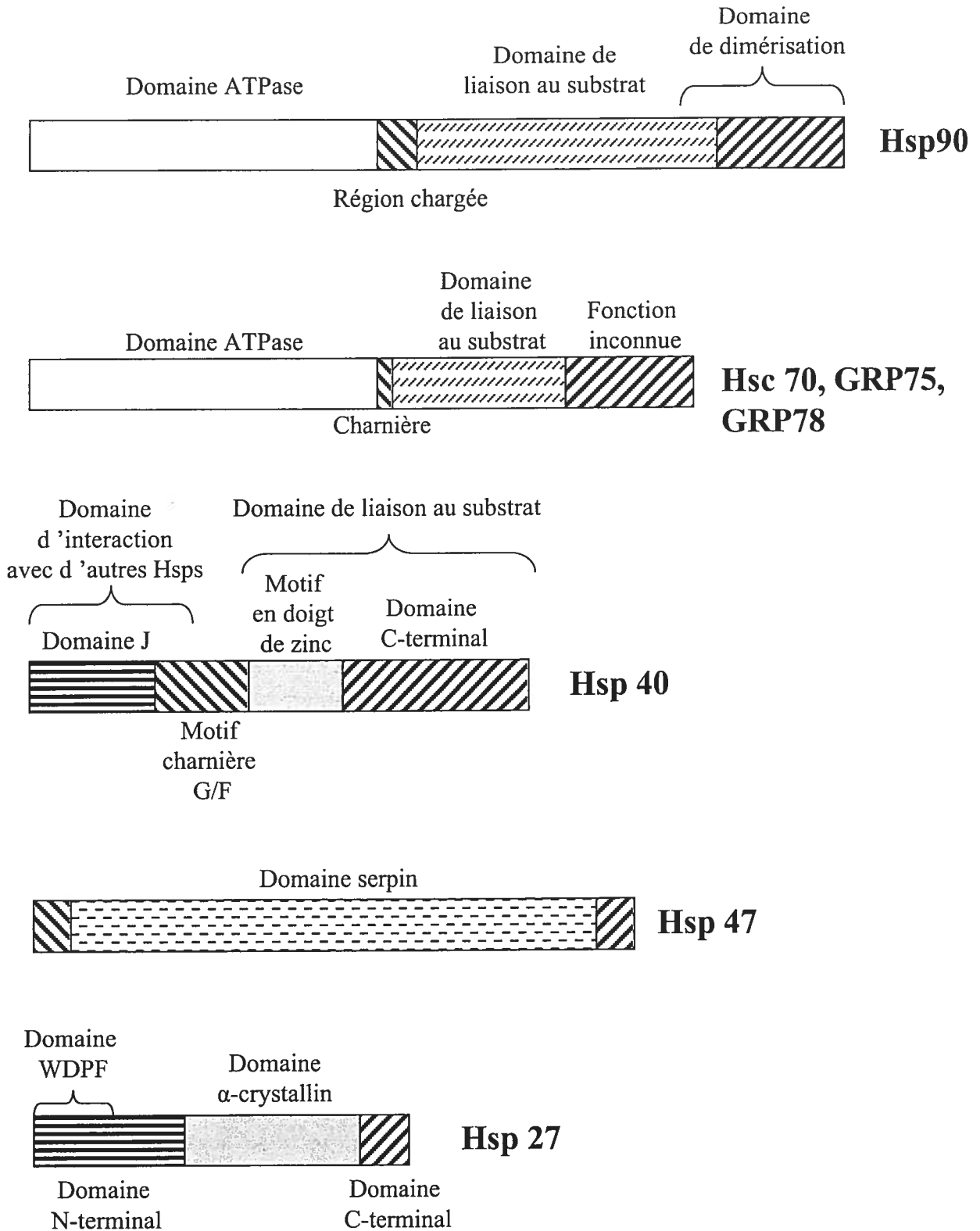


Figure 3: Représentation schématique de la structure des différentes protéines du choc thermique D'après Dafforn et al, 2001, (81); Gusev et al, 2002, (139); Bukau et Horwich, 1998, (58); Young et al, 2001, (438).

présente également dans le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et dans des vésicules cytoplasmiques (343).

Le traitement des CMLV par la ouabaïne provoque une augmentation de la synthèse de cette protéine après 30 min d'incubation (Figure 3B, page 160). Des études précédentes réalisées dans le laboratoire démontrent que la ouabaïne n'influence pas l'expression de Hsp27 et semble favoriser la dégradation de Hsp70 (annexe IV). La ouabaïne diminue l'expression d'un grand nombre de protéines (voir figure 1, page 156), confirmant ainsi la spécificité de l'induction de l'expression de la mortaline. La distribution cellulaire de la mortaline dans les CMLV s'apparente à celle de mot-2, se co-localisant avec les mitochondries et montrant un gradient de concentration du cytoplasme à la membrane nucléaire (figure 3C, page 160).

Afin de déterminer l'implication de la mortaline dans l'inhibition de l'apoptose par l'inversion du rapport $[Na^+]_i/[K^+]_i$ dans les CMLV, des CMLV-E1A, transfectées de façon stable par la région codante de la protéine E1A d'adénovirus, sont transfectées de façon transitoire par la région codante de la protéine mortaline d'origine humaine. Ces cellules offrent une efficacité de transfection de l'ordre de 96% à 98% avec un gène rapporteur β -galactosidase, alors que dans des conditions optimales les CMLV sont fortement résistantes à la transfection (moins de 2% d'efficacité avec ce même gène rapporteur, voir annexe V). L'autre avantage de ces CMLV-E1A est leur sensibilité à l'apoptose induite par la déprivation en sérum (31). Ces CMLV-E1A transfectées par l'ADNc codant pour la mortaline connaissent un retard de 6 h dans le développement de l'apoptose après la déprivation de sérum (figure 5A, 5B, page 164). Ce retard implique également une réduction d'environ 2 fois de l'activité de la caspase-3 par rapport à des CMLV-E1A contrôles transfectées avec un plasmide dépourvu d'insert (figure 5C, page 164).

Des études ont permis de démontrer que la mortaline est co-localisée avec la protéine p53 et inactive sa capacité d'activation transcriptionnelle en empêchant la translocation nucléaire de p53 (417, 1). D'autres études plus récentes démontrent que la liaison de la mortaline avec la protéine p53 se réalise à des sites multiples entre les résidus 312 et 352 de la protéine p53 (418). Les études de localisation de la protéine p53 par immunocytochimie dans les CMLV-E1A surexprimant la mortaline démontrent une localisation périnucléaire de la protéine p53 alors que dans les cellules contrôles, la protéine

p53 est essentiellement nucléaire (figure 6B, page 166). Dans des conditions de stress, la protéine p53 est transférée dans le noyau où elle s'associe pour former un tétramère actif responsable de l'activation de gènes pro-apoptotiques (445). On peut supposer que l'induction de l'expression de la mortaline dans les CMLV traitées à la ouabaine est responsable de la séquestration cytosolique de la protéine p53 en favorisant son aggrégation cytosolique (figure 6B, page 166) et sa dégradation (figure 6A, page 166). L'effet de la mortaline sur la séquestration cytosolique de la protéine p53 peut être bloqué par la présence de la protéine Hsc70 (445). Parmi les protéines identifiées par spectrométrie de masse, la protéine Hsc70 apparaît comme un fragment de 45 kDa (Tableau I, page 168), laissant supposer que la clivage de cette protéine renforce l'activité de la mortaline sur la séquestration cytosolique de la protéine p53.

D'autres travaux ont également permis de mettre en évidence une interaction entre la mortaline et le canal anionique sélectif dépendant du voltage 1 (VDAC1) (365). VDAC1 est une protéine abondante de la membrane mitochondriale externe. Ce canal est une voie majeure pour les mouvements des nucléotides adénines, présente une forte conductance anionique sélective (347). Des études récentes suggèrent également une implication de VDAC1 dans l'apoptose. En effet, la libération du cytochrome c à travers VDAC1 est régulée par des membres de la famille des protéines Bcl-2 pro- ou anti-apoptotiques (374, 373). Puisque la surexpression de la mortaline dans les CMLV-E1A permet une diminution de l'activité de la caspase-3 par deux fois (figure 5C, page 164), il est tentant de penser que la mortaline est capable d'influencer en partie l'activité de VDAC1 au niveau mitochondriale en prévenant l'efflux du cytochrome c puis l'activation subséquente de la caspase 3.

Un autre aspect intéressant de la mortaline est sa localisation génique. La mortaline est localisée sur le chromosome 5q31 chez l'humain et sur le chromosome 18 chez le rat. Chez ce dernier, cette région s'est révélée particulièrement intéressante pour établir des liens avec l'hypertension (184, 121, 76, 384). Chez l'humain, cette région du chromosome contient plusieurs gènes importants pour la régulation de la pression sanguine tels que le gène pour le récepteur β 2-adrénergique, le récepteur α_{1B} -adrénergique, le récepteur pour la dopamine D1, l'annexine VI et plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires comme le récepteur du facteur de

croissance dérivé des plaquettes et la glutathion peroxydase (407, 219). Des analyses de cette région chromosomique ont permis d'établir un lien entre deux phénotypes quantitatifs que sont la pression systolique et diastolique et l'hypertension essentielle dans des populations européennes, sans toutefois permettre de déterminer précisément les gènes impliqués (407). Le gène de la mortaline pourrait également constituer être un gène candidat potentiel dans l'hypertension en contribuant au remodelage vasculaire.

De nombreuses études ont démontré une régulation anormale de la croissance des CMLV (432, 143, 86) et de l'apoptose (149, 346, 85, 239) dans l'hypertension. Ce déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose se caractérise par l'augmentation du rapport paroi/lumière des vaisseaux sanguins (147). Certaines études ont également démontré que ce remodelage vasculaire se caractérise par une inhibition de l'apoptose dans des petites artères de rats SHR (86). Les travaux réalisés par Kisters et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence 89% d'augmentation de la concentration en Na^+ dans des CMLV de SHR par rapport à des rats normotendus Wistar-Kyoto (209). Dans les CMLV, le contenu interne en Na^+ est principalement régulé par la Na^+ , K^+ -ATPase. Dans les SHR, la Na^+ , K^+ -ATPase peut être inhibée par une augmentation des niveaux circulants de FEAO. Plusieurs travaux ont démontré que les facteurs apparentés à la ouabaïne augmentent dans des modèles animaux d'hypertension expérimentale (169) et chez des humains (253, 363). L'implication de la mortaline dans le remodelage vasculaire et l'établissement d'un lien entre les niveaux circulants des FEAO pouvant affecter l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase, la concentration intracellulaire en Na^+ et le niveau d'expression de la mortaline, sont des perspectives attrayantes.

5.5 Conclusion

L'altération de la géométrie des vaisseaux sanguins par une augmentation du rapport paroi/lumière est l'un des mécanismes potentiels du maintien à long terme d'une pression sanguine élevée (140). De nombreux travaux ont rapporté que cette diminution de la lumière des vaisseaux résulte d'un déséquilibre entre la prolifération et l'apoptose qui chacun contribue différemment au remodelage de la paroi des vaisseaux (155, 149, 30, 180, 302). Des études précédentes ont démontré que l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ -

ATPase par la ouabaïne ou dans un milieu dépourvu de K^+ , et l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC retardent le développement du processus apoptotique des CMLV induit la déprivation de sérum. Cette inhibition transitoire de l'apoptose se réalise en amont de l'activation de la caspase-3 (305, 306). Un certain nombre d'études ont observé une augmentation de la présence de FEA0 dans plusieurs formes d'hypertension (151, 107, 131). Le but de cette thèse était d'une part d'identifier les éléments pouvant être directement responsables de l'inhibition de l'apoptose et d'autre part d'envisager la cascade des éléments de signalisation aboutissant à l'expression de ces protéines anti-apoptotiques.

Les résultats obtenus permettent les conclusions suivantes :

1. La diminution de l'apoptose dans les CMLV observée lors de l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase par la ouabaïne et l'activation de la voie de signalisation de l'AMPC est accompagnée de l'induction de la synthèse d'ARN. Les inhibiteurs de la synthèse d'ARN et des protéines abolissent l'effet anti-apoptotique de la ouabaïne mais n'affectent pas l'effet protecteur de l'AMPC vis à vis de l'apoptose. Ces résultats démontrent que l'effet de la ouabaïne se réalise par l'expression de gènes anti-apoptotiques.
2. L'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase dans les CMLV aboutit à une expression rapide de c-Fos puis de c-Jun. L'activation de l'expression de c-Fos est provoquée par une augmentation de la $[Na^+]_i$ mais est indépendante d'une diminution de la $[K^+]_i$, d'un effet de la ouabaïne sur le pHi , d'une modification du volume cellulaire ou de la $[Ca^{2+}]_i$. Contrairement aux facteurs de croissance, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase n'affecte pas l'activité de SRE, CRE et AP-1, c'est à dire les éléments de transcription majeurs du promoteur de *c-fos*.
3. En plus des gènes de réponse primaire, l'inhibition de la Na^+ , K^+ -ATPase modifie l'expression d'un grand nombre de protéines dont la mortaline. La transfection de la mortaline retarde de 6 h le développement du processus apoptotique, en séquestrant la protéine p53 au niveau cytoplasmique et en empêchant ainsi son transfert dans le noyau où elle peut agir comme facteur de transcription des protéines pro-apoptotiques.

La figure 4 (page 190) résume nos différents travaux et leur implication possible dans l'inhibition de l'apoptose. Cette étude suggère que l'activation de la protéine kinase A (PKA) par l'AMPc conduit à la phosphorylation d'activateur (ACT) de la voie apoptotique provoquant ainsi leur inactivation (ACT~P) et/ou à la phosphorylation d'un inhibiteur de la voie apoptotique (INH), induisant son activation (INH~P). Dans l'un ou l'autre de ces cas, la phosphorylation par la PKA réduit considérablement l'activation de la caspase-3 impliquée dans la phase irréversible du processus apoptotique. Un autre aspect de ces travaux a suggéré l'existence d'un élément sensible à une élévation de la $[Na^+]_i$ ($S \rightarrow S^*$) affectant l'expression de gènes de réponse primaire tels que *c-fos* ou éventuellement directement de protéines impliquées dans l'inhibition du processus apoptotique, comme la mortaline, comportant dans leur promoteur un élément sensible au Na^+ (ESNa). L'activation de la mortaline affecte également le processus apoptotique en amont de l'activation de la caspase-3.

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en évidence l'existence d'un couplage excitation/transcription provoqué par une augmentation de la $[Na^+]_i$ et indépendant de la $[Ca^{2+}]_i$ dans des CMLV, et qui est susceptible d'influencer l'expression de protéines impliquées dans l'inhibition du processus apoptotique, comme la mortaline.

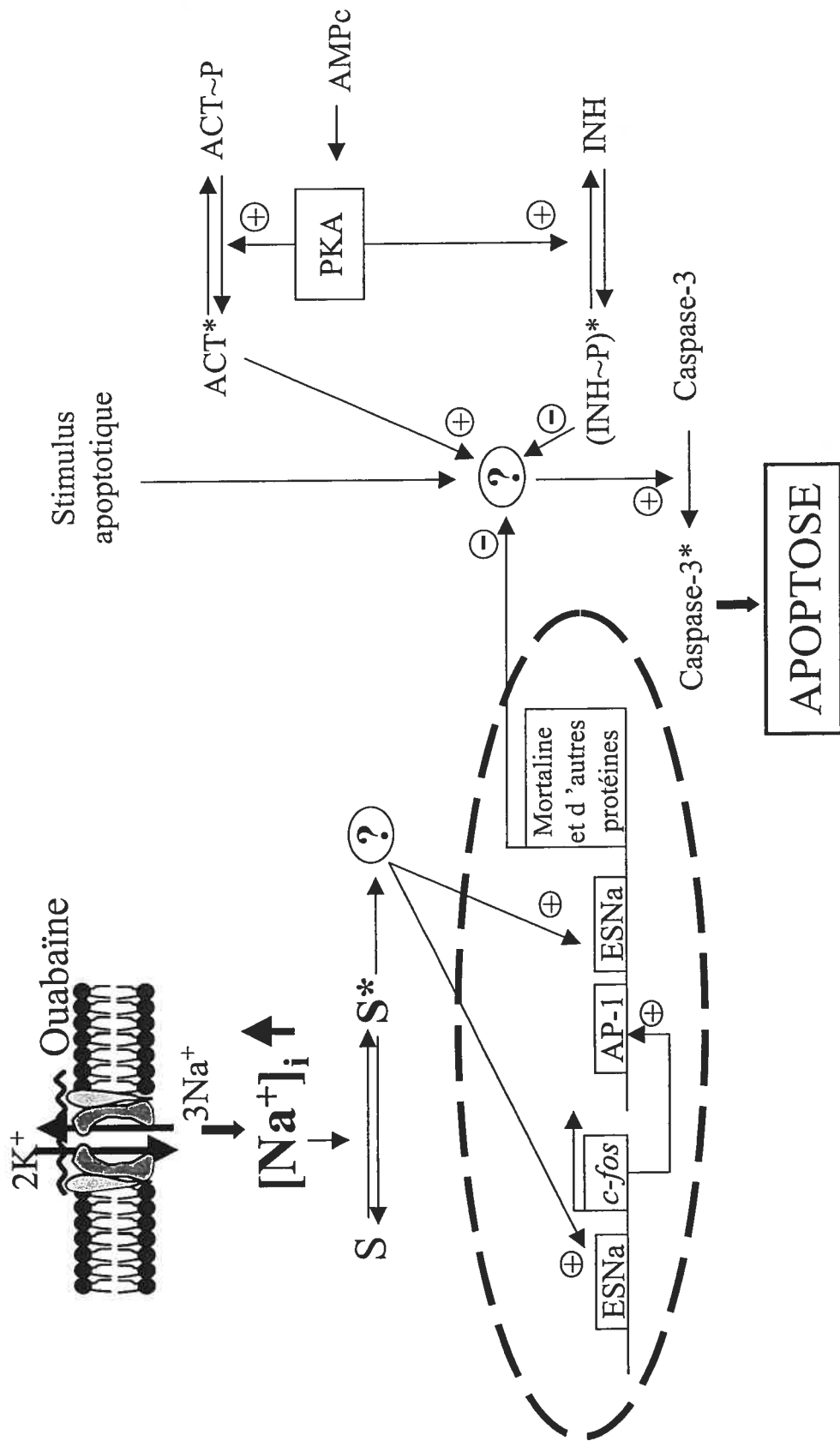


Figure 4: Représentation schématique des voies de signalisation possibles impliquant une augmentation du rapport $[Na^+]/[K^+]_i$ ou de l'AMPc, et aboutissant à l'inhibition de l'apoptose dans des cellules de muscles lisse vasculaire.
 Abréviations: ACT: activateur, ACT ~P: activateur phosphorylé, AMPc: adénosine monophosphate cyclique, AP-1: facteur de transcription « activator protein 1 », ESNa: élément sensible au Na⁺, INH: inhibiteur, INH ~P: inhibiteur phosphorylé, PKA: protéine kinase A, S: senseur de l'élévation de la $[Na^+]_i$, *: forme activée, ⊕ : activation, ⊖ : inhibition, ?: élément inconnu.

5.6 Perspectives de recherche

Les données obtenues dans cette étude, nous permettent d'orienter nos travaux vers l'identification d'éléments sensibles à la $[Na^+]_i$ dans le promoteur de *c-fos* puis vers l'identification de facteur(s) sensible(s) à une élévation de la $[Na^+]_i$ appelée « Na^+ -senseur » (figure 5, page 193).

Les études précédentes utilisant un promoteur tronqué du gène *c-fos* d'origine humaine ont permis de définir une région sensible à une élévation de la $[Na^+]_i$ (286). L'identification de cet élément sensible à la $[Na^+]_i$ implique la génération de fragment de différentes longueurs du promoteur de *c-fos* par l'exonucléase III, ainsi que et la visualisation du fragment répondant positivement à la stimulation par l'intermédiaire du système luciférase (figure 5A, page 193). Cette étude requiert également des cellules plus sensibles à la transfection que les CMLV et qui présentent une activation similaire de l'expression de *c-Fos* lors de leur incubation en présence de 1 mM de ouabaïne. Récemment, nos travaux nous ont permis d'observer que les cellules NIH 3T3, des fibroblastes de souris, répondent favorablement à ces caractéristiques et peuvent être utilisées pour cette étude (figure 5B, page 193) ; En effet, après l'addition de ouabaïne, l'activation de l'expression de *c-Fos* est rapide et identique à celle qui a été observée dans les CMLV, ces cellules sont également très sensibles à la transfection.

Par la suite, l'identification des facteurs interagissant avec cet élément peut être considérée en utilisant un système à un hybride qui permet la détermination d'éléments cis-actifs. Cette technique commercialisée repose sur la répétition en trois exemplaires de l'élément du promoteur sensible au Na^+_i , inséré en amont du promoteur d'un gène rapporteur puis intégré dans l'ADN de levure à la suite de leur transformation. Ces levures sont transformées par une banque d'ADNc de protéines de fusion de cellules HeLa commercialement disponible (BD Biosciences, Clontech) ou d'une banque d'ADNc de CMLV qui sera établie dans le laboratoire (figure 6A, page 194). Il est important de noter que des études précédentes ont pu démontrer que l'incubation des cellules HeLa en présence de ouabaïne conduit également à une augmentation de l'expression de *c-Fos* (286).

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle crucial dans la plupart des processus biologiques. La caractérisation de ces interactions peut être réalisée par le système double hybride développé chez la levure et également commercialisé. Le principe est le même que le système à un hybride mais implique la création de deux banques de molécules hybrides fusionnées respectivement au domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure Gal4 (DNA-BD) et au domaine d'activation de la transcription de la protéine de levure Gal4 (DA). L'interaction entre ces protéines de fusion permet l'activation du gène rapporteur en se liant au niveau d'une séquence située en amont du promoteur (GAL UAS) (figure 6B, page 193). Pour confirmer leur rôle dans l'expression de c-Fos, les différents facteurs identifiés peuvent être surexprimés dans des cellules dont l'expression de c-Fos n'est pas influencée par la ouabaïne au moins jusqu'à 12 heures comme les cellules HEK 293 (figure 6C, page 193).

Nous croyons que l'identification d'un facteur sensible à une augmentation de la $[Na^+]_i$ constitue une nouvelle découverte intéressante en physiologie cellulaire et dans des implications physiopathologiques telles que l'hypertension induite par la charge en sel.

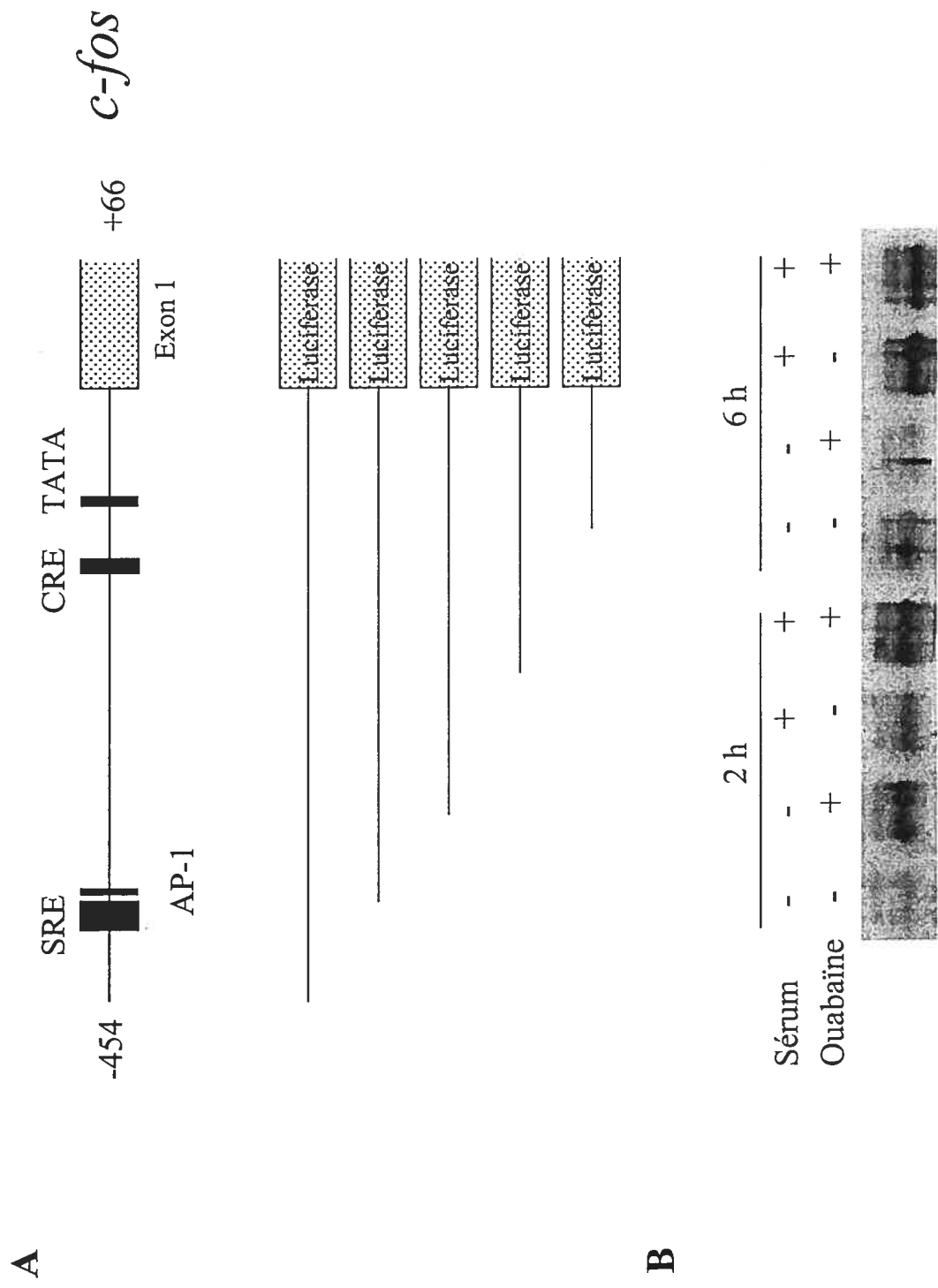


Figure 5 : Etude du promoteur de *c-fos*: identification de l'élément sensible au Na^+ (A), Immunobuvardage illustrant l'expression de *c-Fos* dans des cellules NIH 3T3 traitées à la ouabaine 1 mM (B).

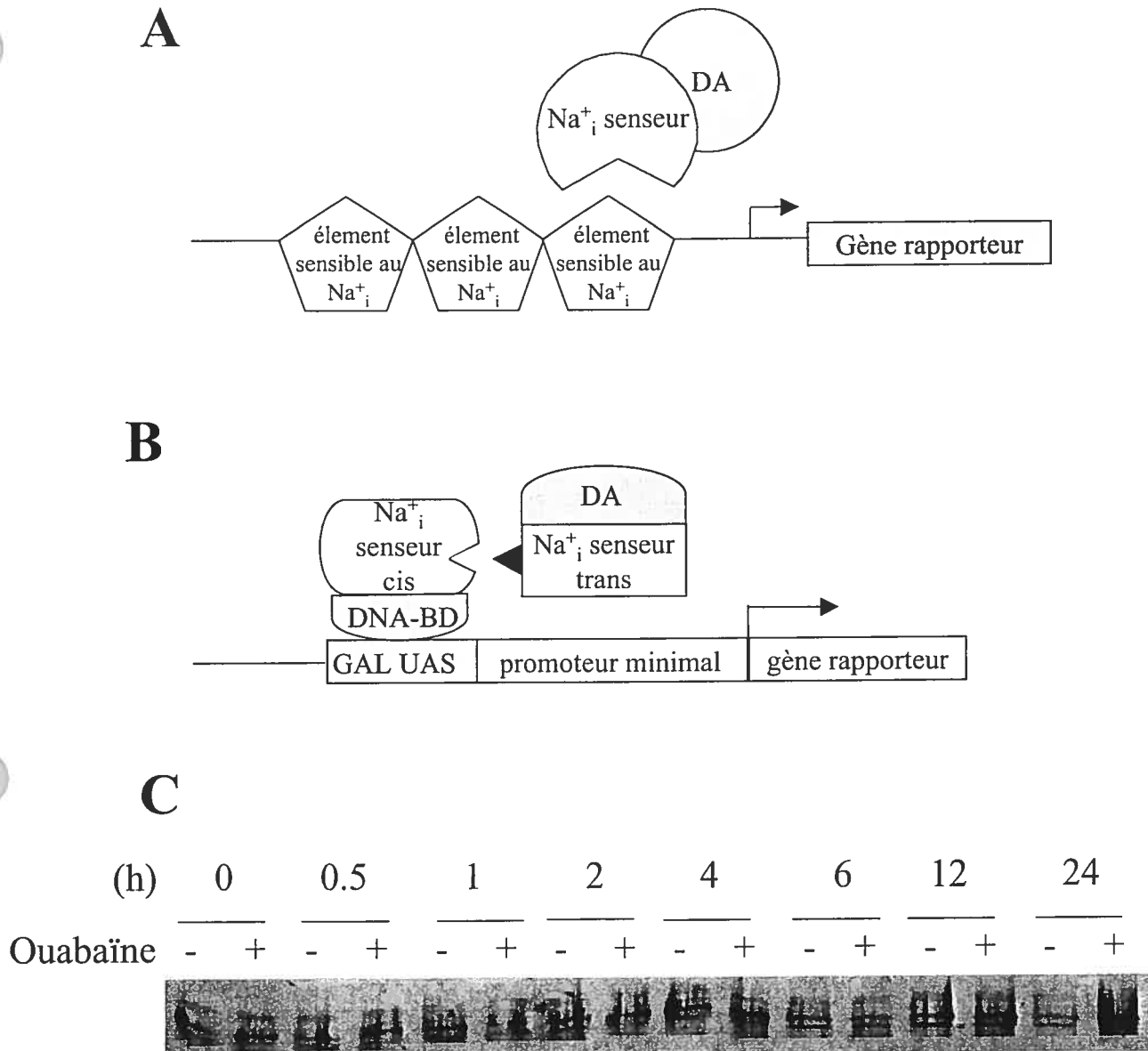


Figure 6: Identification de facteurs sensibles à l'augmentation de la Na^+_i . (A) Système à un hybride, la séquence de l'élément sensible au Na^+_i , répété trois fois, est insérée dans l'ADN de levure. Cette nouvelle lignée est transformée par une banque d'ADNc de protéines de fusion permettant l'identification de facteurs cis-actifs. (B) Système double hybride basé sur la transformation de levure par deux banques d'ADNc de protéines de fusion comportant soit le domaine de liaison à l'ADN (DNA-BD) soit le domaine d'activation (DA). La reconnaissance entre les protéines issues de ces deux banques permet l'activation de l'expression du gène rapporteur. (C) Immunobuvardage représentant l'expression de c-Fos dans les cellules HEK 293.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Akakura, S., M. Yoshida, Y. Yoneda, and S. Horinouchi.** A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J.Biol.Chem.* 276: 14649-14657, 2001.
2. **Aksentsev, S.L., A.A. Mongin, S.N. Orlov, A.A. Rakovich, G.V. Kaler, and S.V. Konev.** Osmotic regulation of sodium pump in rat brain synaptosomes: the role of cytoplasmic sodium. *Brain Res.* 644: 1-6, 1994.
3. **Albers, R.W., S. Fahn, and G.J. Koval.** The role of sodium ions in the activation of *Electrophorus* electric organ adenosine triphosphatase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 50: 474-481, 1963.
4. **Allen, J.C., X. Zhao, T. Odebunmi, S. Jemelka, R.M. Medford, T.A. Pressley, and R.W. Mercer.** Alpha 1T can support Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase: Na⁺ pump functions in expression systems. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 834: 457-458, 1997.
5. **Allen, R.T., W.J. Hunter, and D.K. Agrawal.** Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 37: 215-228, 1997.
6. **Anderson, M.E.** Connections count : excitation-contraction meets excitation-transcription coupling. *Circ.Res.* 86: 717-719, 2000.
7. **Ando, K., N. Omi, T. Shimosawa, K. Takahashi, and T. Fujita.** Effects of ouabain on the growth and DNA synthesis of PC12 cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 37: 233-238, 2001.
8. **Antolovic, R., N. Bauer, M. Mohadjerani, H. Kost, H. Neu, U. Kirch, E.G. Grunbaum, and W. Schoner.** Endogenous ouabain and its binding globulin: effects of physical exercise and study on the globulin's tissue distribution. *Hypertens.Res.* 23 Suppl: S93-S982000.

9. **Antonicek, H., E. Persohn, and M. Schachner.** Biochemical and functional characterization of a novel neuron-glia adhesion molecule that is involved in neuronal migration. *J.Cell Biol.* 104: 1587-1595, 1987.
10. **Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J.J. Mermod, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul, and J.C. Martinou.** Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277: 370-372, 1997.
11. **Apell, H.J.** Electrogenic properties of the Na,K pump. *J.Membr.Biol.* 110: 103-114, 1989.
12. **Aperia, A., J. Fryckstedt, U. Holtback, R. Belusa, X.J. Cheng, A.C. Eklof, D. Li, Z.M. Wang, and Y. Ohtomo.** Cellular mechanisms for bi-directional regulation of tubular sodium reabsorption. *Kidney Int.* 49: 1743-1747, 1996.
13. **Aperia, A., F. Ibarra, L.B. Svensson, C. Klee, and P. Greengard.** Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity in renal tubule cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 7394-7397, 1992.
14. **Arnon, A., J.M. Hamlyn, and M.P. Blaustein.** Ouabain augments Ca⁽²⁺⁾ transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na⁽⁺⁾. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 279: H679-H6912000.
15. **Arystarkhova, E. and K.J. Sweadner.** Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J.Biol.Chem.* 272: 22405-22408, 1997.
16. **Ashkenazi, A. and V.M. Dixit.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308, 1998.
17. **Askari, A.** (Na⁺ + K⁺)-ATPase: on the number of the ATP sites of the functional unit. *J.Bioenerg.Biomembr.* 19: 359-374, 1987.

18. **Aydemir-Koksoy, A., J. Abramowitz, and J.C. Allen.** Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J.Biol.Chem.* 276: 46605-46611, 2001.
19. **Aydemir-Koksoy, A. and J.C. Allen.** Low concentrations of ouabain induce vascular smooth muscle cell proliferation. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le.-grand.)* 47: 341-345, 2001.
20. **Baker, P.F. and J.S. Willis.** Potassium ions and the binding of cardiac glycosides to mammalian cells. *Nature* 226: 521-523, 1970.
21. **Bamberg, E., R.J. Clarke, and K. Fendler.** Electrogenic properties of the Na⁺,K⁺-ATPase probed by presteady state and relaxation studies. *J.Bioenerg.Biomembr.* 33: 401-405, 2001.
22. **Barbiero, G., F. Duranti, G. Bonelli, J.S. Amenta, and F.M. Baccino.** Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp.Cell Res.* 217: 410-418, 1995.
23. **Bardin, C. and R.M. Johnstone.** Sodium-dependent amino acid transport in reconstituted membrane vesicles from Ehrlich ascites cell plasma membranes. *J.Biol.Chem.* 253: 1725-1732, 1978.
24. **Basanez, G., A. Nechushtan, O. Drozhinin, A. Chanturiya, E. Choe, S. Tutt, K.A. Wood, Y. Hsu, J. Zimmerberg, and R.J. Youle.** Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 5492-5497, 1999.
25. **Beggah, A.T., P. Jaunin, and K. Geering.** Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 272: 10318-10326, 1997.

26. **Beguin, P., A.T. Beggah, A.V. Chibalin, P. Burgener-Kairuz, F. Jaisser, P.M. Mathews, B.C. Rossier, S. Cotecchia, and K. Geering.** Phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 269: 24437-24445, 1994.
27. **Beguin, P., G. Crambert, S. Guennoun, H. Garty, J.D. Horisberger, and K. Geering.** CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J.* 20: 3993-4002, 2001.
28. **Beguin, P., U. Hasler, A. Beggah, J.D. Horisberger, and K. Geering.** Membrane integration of Na,K-ATPase alpha-subunits and beta-subunit assembly. *J.Biol.Chem.* 273: 24921-24931, 1998.
29. **Beguin, P., X. Wang, D. Firsov, A. Puoti, D. Claeys, J.D. Horisberger, and K. Geering.** The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO J.* 16: 4250-4260, 1997.
30. **Bennett, M.R.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc.Res.* 41: 361-368, 1999.
31. **Bennett, M.R., G.I. Evan, and S.M. Schwartz.** Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ.Res.* 77: 266-273, 1995.
32. **Bennett, V.** Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2: 51-56, 1990.
33. **Berk, B.C.** Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol.Rev.* 81: 999-1030, 2001.
34. **Beron, J., L. Mastroberardino, A. Spillmann, and F. Verrey.** Aldosterone modulates sodium kinetics of Na,K-ATPase containing an alpha 1 subunit in A6 kidney cell epithelia. *Mol.Biol.Cell* 6: 261-271, 1995.

35. **Bertorello, A.M.** Diacylglycerol activation of protein kinase C results in a dual effect on Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity from intact renal proximal tubule cells. *J.Cell Sci.* 101 (Pt 2): 343-347, 1992.
36. **Bertorello, A.M., A. Aperia, S.I. Walaas, A.C. Nairn, and P. Greengard.** Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88: 11359-11362, 1991.
37. **Blanco, G., J.C. Koster, and R.W. Mercer.** The alpha subunit of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 8542-8546, 1994.
38. **Blanco, G., R.J. Melton, G. Sanchez, and R.W. Mercer.** Functional characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 38: 13661-13669, 1999.
39. **Blanco, G. and R.W. Mercer.** Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am.J.Physiol.* 275: F633-F650, 1998.
40. **Blaustein, M.P.** Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am.J.Physiol.* 232: C165-C173, 1977.
41. **Blaustein, M.P.** Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am.J.Physiol.* 264: C1367-C1387, 1993.
42. **Blaustein, M.P.** Endogenous ouabain: role in the pathogenesis of hypertension. *Kidney Int.* 49: 1748-1753, 1996.
43. **Blaustein, M.P. and W.J. Lederer.** Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol.Rev.* 79: 763-854, 1999.

44. **Blot-Chabaud, M., N. Coutry, M. Laplace, J. Bonvalet, and N. Farman.** Role of protein phosphatase in the regulation of Na⁺-K⁺-ATPase by vasopressin in the cortical collecting duct. *J.Membr.Biol.* 153: 233-239, 1996.
45. **Blot-Chabaud, M., F. Wanstok, J.P. Bonvalet, and N. Farman.** Cell sodium-induced recruitment of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase pumps in rabbit cortical collecting tubules is aldosterone-dependent. *J.Biol.Chem.* 265: 11676-11681, 1990.
46. **Boardman, L., M. Huett, J.F. Lamb, J.P. Newton, and J.M. Polson.** Evidence for the genetic control of the sodium pump density in HeLa cells. *J.Physiol.* 241: 771-794, 1974.
47. **Boardman, L.J., J.F. Lamb, and D. McCall.** Uptake of (3 H)ouabain and Na pump turnover rates in cells cultured in ouabain. *J.Physiol.* 225: 619-635, 1972.
48. **Bolivar, J.J., A. Lazaro, S. Fernandez, E. Stefani, V. Pena-Cruz, C. Lechene, and M. Cerejido.** Rescue of a wild-type MDCK cell by a ouabain-resistant mutant. *Am.J.Physiol.* 253: C151-C161, 1987.
49. **Borer, R.A., C.F. Lehner, H.M. Eppenberger, and E.A. Nigg.** Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56: 379-390, 1989.
50. **Borner, C. and L. Monney.** Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death.Differ.* 6: 497-507, 1999.
51. **Bortner, C.D. and J.A. Cidlowski.** A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem.Pharmacol.* 56: 1549-1559, 1998.
52. **Bortner, C.D. and J.A. Cidlowski.** Caspase independent/dependent regulation of K⁽⁺⁾, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J.Biol.Chem.* 274: 21953-21962, 1999.
53. **Bortner, C.D., F.M.J. Hughes, and J.A. Cidlowski.** A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 272: 32436-32442, 1997.

54. **Bowen, J.W. and A. McDonough.** Pretranslational regulation of Na-K-ATPase in cultured canine kidney cells by low K⁺. *Am.J.Physiol.* 252: C179-C189, 1987.
55. **Brodie, C., A. Tordai, J. Saloga, J. Domenico, and E.W. Gelfand.** Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. *J.Cell Physiol.* 165: 246-253, 1995.
56. **Bronner, C., M. Mousli, N. Eleno, and Y. Landry.** Resting plasma membrane potential of rat peritoneal mast cells is set predominantly by the sodium pump. *FEBS Lett.* 255: 401-404, 1989.
57. **Buhler, R. and H.J. Apell.** Sequential potassium binding at the extracellular side of the Na,K-pump. *J.Membr.Biol.* 145: 165-173, 1995.
58. **Bukau, B. and A.L. Horwich.** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366, 1998.
59. **Canessa, M., J.R. Romero, N. Ruiz-Opazo, and V.L. Herrera.** The alpha 1 Na(+)-K⁺ pump of the Dahl salt-sensitive rat exhibits altered Na⁺ modulation of K⁺ transport in red blood cells. *J.Membr.Biol.* 134: 107-122, 1993.
60. **Cantiello, H.F.** Actin filaments stimulate the Na(+)-K(+)-ATPase. *Am.J.Physiol.* 269: F637-F643, 1995.
61. **Caplan, M.J.** Ion pumps in epithelial cells: sorting, stabilization, and polarity. *Am.J.Physiol.* 272: G1304-G1313, 1997.
62. **Cayanis, E., J.J. Russo, Y.S. Wu, and I.S. Edelman.** Serum independence of low K⁺ induction of Na,K-ATPase: possible role of c-fos. *J.Membr.Biol.* 125: 163-170, 1992.
63. **Chan, H.C. and D.J. Nelson.** Chloride-dependent cation conductance activated during cellular shrinkage. *Science* 257: 669-671, 1992.

64. **Charnock, J.S. and R.L. Post.** Evidence of the mechanism of ouabain inhibition of cation activated adenosine triphosphatase. *Nature* 199: 910-911, 1963.
65. **Cheng, S.X., O. Aizman, A.C. Nairn, P. Greengard, and A. Aperia.** $[Ca^{2+}]_i$ determines the effects of protein kinases A and C on activity of rat renal Na^+,K^+ -ATPase. *J.Physiol.* 518 (Pt 1): 37-46, 1999.
66. **Cheng, X.J., J.O. Hoog, A.C. Nairn, P. Greengard, and A. Aperia.** Regulation of rat $Na(+)-K(+)-ATPase$ activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser-943 by PKA. *Am.J.Physiol.* 273: C1981-C1986 1997.
67. **Chibalin, A.V., A.I. Katz, P.O. Berggren, and A.M. Bertorello.** Receptor-mediated inhibition of renal $Na(+)-K(+)-ATPase$ is associated with endocytosis of its alpha- and beta-subunits. *Am.J.Physiol.* 273: C1458-C1465 1997.
68. **Chou, J.J., H. Li, G.S. Salvesen, J. Yuan, and G. Wagner.** Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96: 615-624, 1999.
69. **Chou, S.Y., J.G. Porush, and P.F. Faubert.** Renal medullary circulation: hormonal control. *Kidney Int.* 37: 1-13, 1990.
70. **Chow, D.C. and J.G. Forte.** Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J.Exp.Biol.* 198 (Pt 1): 1-17, 1995.
71. **Clausen, T. and O.B. Nielsen.** The $Na^+,K(+)-pump$ and muscle contractility. *Acta Physiol.Scand.* 152: 365-373, 1994.
72. **Coates, P.J., D.J. Jamieson, K. Smart, A.R. Prescott, and P.A. Hall.** The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr.Biol.* 7: 607-610, 1997.
73. **Cohen, G.M.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 326 (Pt 1): 1-16, 1997.

74. **Colombo, E., J.C. Marine, D. Danovi, B. Falini, and P.G. Pelicci.** Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat.Cell Biol.* 4: 529-533, 2002.
75. **Colonna, T.E., L. Huynh, and D.M. Fambrough.** Subunit interactions in the Na,K-ATPase explored with the yeast two-hybrid system. *J.Biol.Chem.* 272: 12366-12372, 1997.
76. **Cowley, A.W.J., M. Stoll, A.S. Greene, M.L. Kaldunski, R.J. Roman, P.J. Tonellato, N.J. Schork, P. Dumas, and H.J. Jacob.** Genetically defined risk of salt sensitivity in an intercross of Brown Norway and Dahl S rats. *Physiol.Genomics* 2: 107-115, 2000.
77. **Crambert, G., U. Hasler, A.T. Beggah, C. Yu, N.N. Modyanov, J.D. Horisberger, L. Lelievre, and K. Geering.** Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J.Biol.Chem.* 275: 1976-1986, 2000.
78. **Crane, R.K. and F.C. Dorando.** On the mechanism of Na⁺-dependent glucose transport. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 339: 46-52, 1980.
79. **Cuff, J.M. and M.A. Lichtman.** Adaptation of potassium metabolism and restoration of mitosis during prolonged treatment of mouse lymphoblasts with ouabain. *J.Cell Physiol.* 85: 217-226, 1975.
80. **Cutler, C.P., I.L. Sanders, and G. Cramb.** Isolation of six putative P-type ATPase beta subunit PCR fragments from the brain of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 834: 123-125, 1997.
81. **Dafforn, T.R., M. Della, and A.D. Miller.** The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 276: 49310-49319, 2001.

82. **Davis, A., K. Hogarth, D. Fernandes, J. Solway, J. Niu, V. Kolenko, D. Browning, J.M. Miano, S.N. Orlov, and N.O. Dulin.** Functional significance of protein kinase A (PKA) activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent expression by PKA. *Cellular signaling* 2003.(In Press)
83. **Dean R.B.** Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Biol.Symp.* 3: 331-348, 19410.
84. **Deng, A.Y., H. Dene, and J.P. Rapp.** Mapping of a quantitative trait locus for blood pressure on rat chromosome 2. *J.Clin.Invest.* 94: 431-436, 1994.
85. **Devlin, A.M., J.S. Clark, J.L. Reid, and A.F. Dominiczak.** DNA synthesis and apoptosis in smooth muscle cells from a model of genetic hypertension. *Hypertension* 36: 110-115, 2000.
86. **Diez, J., A. Panizo, M. Hernandez, and J. Pardo.** Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 29: 776-780, 1997.
87. **Dijkstra, M., 'V. In, G.J. van den Berg, M. Muller, F. Kuipers, and R.J. Vonk.** Adenosine triphosphate-dependent copper transport in isolated rat liver plasma membranes. *J.Clin.Invest.* 95: 412-416, 1995.
88. **Domaszewicz, W. and H. Apell.** Binding of the third Na⁺ ion to the cytoplasmic side of the Na,K-ATPase is electrogenic. *FEBS Lett.* 458: 241-246, 1999.
89. **Doris, P.A., A. Hayward-Lester, D. Bourne, and D.M. Stocco.** Ouabain production by cultured adrenal cells. *Endocrinology* 137: 533-539, 1996.
90. **Dulin, N.O., J. Niu, D.D. Browning, R.D. Ye, and T. Voyno-Yasenetskaya.** Cyclic AMP-independent activation of protein kinase A by vasoactive peptides. *J.Biol.Chem.* 276: 20827-20830, 2001.

91. **Dunbar, L.A. and M.J. Caplan.** Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺- and H⁺, K⁺-ATPases. *J.Biol.Chem.* 276: 29617-29620, 2001.
92. **Eakle, K.A., M.A. Kabalin, S.G. Wang, and R.A. Farley.** The influence of beta subunit structure on the stability of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase complexes and interaction with K⁺. *J.Biol.Chem.* 269: 6550-6557, 1994a.
93. **Eakle, K.A., M.A. Kabalin, S.G. Wang, and R.A. Farley.** The influence of beta subunit structure on the stability of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase complexes and interaction with K⁺. *J.Biol.Chem.* 269: 6550-6557, 1994b.
94. **Emanuel, J.R., S. Graw, D. Housman, and R. Levenson.** Identification of a region within the Na,K-ATPase alpha subunit that contributes to differential ouabain sensitivity. *Mol.Cell Biol.* 9: 3744-3749, 1989.
95. **Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata.** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998.
96. **Erdmann, E., H.D. Bolte, and W. Schoner.** Cardiac glycoside receptor in potassium depletion. *Recent.Adv.Stud.Cardiac.Struct.Metab.* 5: 351-358, 1975.
97. **Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson, and J.C. Martinou.** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol.Cell Biol.* 20: 929-935, 2000.
98. **Farman, N.** Na,K-pump expression and distribution in the nephron. *Miner.Electrolyte Metab.* 22: 272-278, 1996.
99. **Farman, N., J.P. Bonvalet, and J.R. Seckl.** Aldosterone selectively increases Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase alpha 3-subunit mRNA expression in rat hippocampus. *Am.J.Physiol.* 266: C423-C428, 1994.

100. **Feltes, T.F., C.L. Seidel, D.K. Dennison, S. Amick, and J.C. Allen.** Relationship between functional Na⁺ pumps and mitogenesis in cultured coronary artery smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 264: C169-C178 1993.
101. **Feraille, E., P. Beguin, M.L. Carranza, S. Gonin, M. Rousselot, P.Y. Martin, H. Favre, and K. Geering.** Is phosphorylation of the alpha1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C? *Mol.Biol.Cell* 11: 39-50, 2000.
102. **Feraille, E., M.L. Carranza, S. Gonin, P. Beguin, C. Pedemonte, M. Rousselot, J. Caverzasio, K. Geering, P.Y. Martin, and H. Favre.** Insulin-induced stimulation of Na⁺,K(+)-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. *Mol.Biol.Cell* 10: 2847-2859, 1999.
103. **Feraille, E., M.L. Carranza, M. Rousselot, and H. Favre.** Insulin enhances sodium sensitivity of Na-K-ATPase in isolated rat proximal convoluted tubule. *Am.J.Physiol.* 267: F55-F62 1994.
104. **Feraille, E., M.L. Carranza, M. Rousselot, and H. Favre.** Modulation of Na⁺,K(+)-ATPase activity by a tyrosine phosphorylation process in rat proximal convoluted tubule. *J.Physiol.* 498 (Pt 1): 99-108, 1997.
105. **Feraille, E. and A. Doucet.** Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol.Rev.* 81: 345-418, 2001.
106. **Ferrandi, M. and P. Manunta.** Ouabain-like factor: is this the natriuretic hormone? *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 9: 165-171, 2000.
107. **Ferrandi, M., P. Manunta, R. Rivera, G. Bianchi, and P. Ferrari.** Role of the ouabain-like factor and Na-K pump in rat and human genetic hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* 20: 629-639, 1998.

108. **Ferrandi, M., S. Salardi, G. Tripodi, P. Barassi, R. Rivera, P. Manunta, R. Goldshleger, P. Ferrari, G. Bianchi, and S.J. Karlish.** Evidence for an interaction between adducin and Na(+)-K(+)-ATPase: relation to genetic hypertension. *Am.J.Physiol.* 277: H1338-H1349, 1999.
109. **Feschenko, M.S. and K.J. Sweadner.** Conformation-dependent phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase A and protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 269: 30436-30444, 1994.
110. **Feschenko, M.S. and K.J. Sweadner.** Structural basis for species-specific differences in the phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 270: 14072-14077, 1995.
111. **Feschenko, M.S., R.K. Wetzel, and K.J. Sweadner.** Phosphorylation of Na,K-ATPase by protein kinases. Sites, susceptibility, and consequences. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 834: 479-488, 1997.
112. **Fisone, G., S.X. Cheng, A.C. Nairn, A.J. Czernik, H.C.J. Hemmings, J.O. Hoog, A.M. Bertorello, R. Kaiser, T. Bergman, and H. Jornvall.** Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K⁺-ATPase and effects of site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* 269: 9368-9373, 1994.
113. **Fisone, G., G.L. Snyder, A. Aperia, and P. Greengard.** Na⁺,K⁺-ATPase phosphorylation in the choroid plexus: synergistic regulation by serotonin/protein kinase C and isoproterenol/cAMP-PK/PP-1 pathways. *Mol.Med.* 4: 258-265, 1998.
114. **Folkow, B.** The fourth Volhard lecture: cardiovascular structural adaptation; its role in the initiation and maintenance of primary hypertension. *Clin.Sci.Mol.Med.Suppl.* 4: 3s-22s, 1978.
115. **Folkow, B., G. Grimby, and O. Thulesius.** Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. *Acta Physiol.Scand.* 44: 255-272, 1958.

116. **Fryckstedt, J. and A. Aperia.** Sodium-dependent regulation of sodium, potassium-adenosine-tri-phosphatase (Na⁺, K⁺)-ATPase) activity in medullary thick ascending limb of Henle segments. Effect of cyclic-adenosine-monophosphate guanosine-nucleotide-binding-protein activity and arginine vasopressin. *Acta Physiol.Scand.* 144: 185-190, 1992.
117. **Gagnon, F., P. Hamet, and S.N. Orlov.** Na⁺,K⁺ pump and Na⁺-coupled ion carriers in isolated mammalian kidney epithelial cells: regulation by protein kinase C. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 77: 305-319, 1999.
118. **Galli, C., O. Meucci, A. Scorziello, T.M. Werge, P. Calissano, and G. Schettini.** Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J.Neurosci.* 15: 1172-1179, 1995.
119. **Gardos G.** Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen. *Acta Physiol.Acad.Sci.Hung.* 6: 191-199, 19540.
120. **Garrahan, P.J. and I.M. Glynn.** Driving the sodium pump backwards to form adenosine triphosphate. *Nature* 211: 1414-1415, 1966.
121. **Garrett, M.R., H. Dene, R. Walder, Q.Y. Zhang, G.T. Cicila, S. Assadnia, A.Y. Deng, and J.P. Rapp.** Genome scan and congenic strains for blood pressure QTL using Dahl salt-sensitive rats. *Genome Res.* 8: 711-723, 1998.
122. **Garrido, C., S. Gurbuxani, L. Ravagnan, and G. Kroemer.** Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 286: 433-442, 2001.
123. **Geck, P. and B. Pfeiffer.** Na⁺ + K⁺ + 2Cl⁻ cotransport in animal cells--its role in volume regulation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 456: 166-182, 1985.
124. **Geering, K.** Topogenic motifs in P-type ATPases. *J.Membr.Biol.* 174: 181-190, 2000.

125. **Geering, K.** The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J.Bioenerg.Biomembr.* 33: 425-438, 2001.
126. **Giesen, E.M., J.L. Imbs, M. Grima, M. Schmidt, and J. Schwartz.** Modulation of renal ATPase activities by cyclic AMP. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 120: 619-624, 1984.
127. **Gloor, S.M.** Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Lett.* 412: 1-4, 1997.
128. **Glynn, I.M.** The electrogenic sodium pump. *Soc.Gen.Physiol.Ser.* 38: 33-48, 1984.
129. **Glynn, I.M.** Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. *J.Physiol.* 462: 1-30, 1993.
130. **Glynn, I.M., V.L. Lew, and U. Luthi.** Reversal of the potassium entry mechanism in red cells, with and without reversal of the entire pump cycle. *J.Physiol.* 207: 371-391, 1970.
131. **Goto, A. and K. Yamada.** Ouabain-like factor. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 7: 189-196, 1998.
132. **Goto, A., K. Yamada, M. Ishii, M. Yoshioka, T. Ishiguro, C. Eguchi, and T. Sugimoto.** Purification and characterization of human urine-derived digitalis-like factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 154: 847-853, 1988.
133. **Gottlieb, S.S., A.C. Rogowski, M. Weinberg, C.M. Krichten, B.P. Hamilton, and J.M. Hamlyn.** Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 86: 420-425, 1992.
134. **Green, D.R. and J.C. Reed.** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998.

135. **Grieco, D., A. Porcellini, E.V. Avvedimento, and M.E. Gottesman.** Requirement for cAMP-PKA pathway activation by M phase-promoting factor in the transition from mitosis to interphase. *Science* 271: 1718-1723, 1996.
136. **Grinstein, S., C.A. Clarke, and A. Rothstein.** Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. *J.Gen.Physiol.* 82: 619-638, 1983.
137. **Gross, A., X.M. Yin, K. Wang, M.C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S.J. Korsmeyer.** Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J.Biol.Chem.* 274: 1156-1163, 1999.
138. **Gulbins, E., A. Jekle, K. Ferlinz, H. Grassme, and F. Lang.** Physiology of apoptosis. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* 279: F605-F615, 2000.
139. **Gusev, N.B., N.V. Bogatcheva, and S.B. Marston.** Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 67: 511-519, 2002.
140. **Guyton, A.C.** Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816, 1991.
141. **Haas, M., A. Askari, and Z. Xie.** Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J.Biol.Chem.* 275: 27832-27837, 2000.
142. **Hadrava, V., J. Tremblay, and P. Hamet.** Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 13: 589-597, 1989.
143. **Hadrava, V., J. Tremblay, R.P. Sekaly, and P. Hamet.** Accelerated entry of aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats into the S phase of the cell cycle. *Biochem.Cell Biol.* 70: 599-604, 1992.

144. **Hakem, R., A. Hakem, G.S. Duncan, J.T. Henderson, M. Woo, M.S. Soengas, A. Elia, J.L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S.A. Kaufman, S.W. Lowe, J.M. Penninger, and T.W. Mak.** Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94: 339-352, 1998.
145. **Hamet, P.** Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 4: 1-7, 1995.
146. **Hamet, P.** Environmentally-regulated genes of hypertension. *Clin.Exp.Hypertens.* 18: 267-278, 1996.
147. **Hamet, P., D. deBlois, T.V. Dam, L. Richard, E. Teiger, B.S. Tea, S.N. Orlov, and J. Tremblay.** Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 74: 850-861, 1996.
148. **Hamet, P., P. Moreau, T.V. Dam, S.N. Orlov, B.S. Tea, D. de Blois, and J. Tremblay.** The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *J.Hypertens.Suppl.* 14: S65-S70, 1996.
149. **Hamet, P., L. Richard, T.V. Dam, E. Teiger, S.N. Orlov, L. Gaboury, F. Gossard, and J. Tremblay.** Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26: 642-648, 1995.
150. **Hamlyn, J.M., M.P. Blaustein, S. Bova, D.W. DuCharme, D.W. Harris, F. Mandel, W.R. Mathews, and J.H. Ludens.** Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88: 6259-6263, 1991.
151. **Hamlyn, J.M., B.P. Hamilton, and P. Manunta.** Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and a hypothesis. *J.Hypertens.* 14: 151-167, 1996.

152. **Hamlyn, J.M., Z.R. Lu, P. Manunta, J.H. Ludens, K. Kimura, J.R. Shah, J. Laredo, J.P. Hamilton, M.J. Hamilton, and B.P. Hamilton.** Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin.Exp.Hypertens.* 20: 523-533, 1998.
153. **Harris, E.J. and M. Maizels.** The permeability of human red cells to sodium. *J.Physiol.* 113: 506-524, 19510.
154. **Hasler, U., X. Wang, G. Crambert, P. Beguin, F. Jaisser, J.D. Horisberger, and K. Geering.** Role of beta-subunit domains in the assembly, stable expression, intracellular routing, and functional properties of Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 273: 30826-30835, 1998.
155. **Heagerty, A.M., C. Aalkjaer, S.J. Bund, N. Korsgaard, and M.J. Mulvany.** Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 21: 391-397, 1993.
156. **Hernandez, J.A. and S. Chifflet.** Electrogenic properties of the sodium pump in a dynamic model of membrane transport. *J.Membr.Biol.* 176: 41-52, 2000.
157. **Hernandez, J.A. and E. Cristina.** Modeling cell volume regulation in nonexcitable cells: the roles of the Na⁺ pump and of cotransport systems. *Am.J.Physiol.* 275: C1067-C10801998.
158. **Hernandez, R.** Na⁺/K⁺-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem.Int.* 20: 1-10, 1992.
159. **Herrera, V.L., T. Cova, D. Sassoon, and N. Ruiz-Opazo.** Developmental cell-specific regulation of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase alpha 1-, alpha 2-, and alpha 3-isoform gene expression. *Am.J.Physiol.* 266: C1301-C13121994.
160. **Herrera, V.L. and N. Ruiz-Opazo.** Alteration of alpha 1 Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase 86Rb⁺ influx by a single amino acid substitution. *Science* 249: 1023-1026, 1990.

161. **Heyse, S., I. Wuddel, H.J. Apell, and W. Sturmer.** Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants. *J.Gen.Physiol.* 104: 197-240, 1994.
162. **Hilton, P.J., R.W. White, G.A. Lord, G.V. Garner, D.B. Gordon, M.J. Hilton, L.G. Forni, W. McKinnon, F.M. Ismail, M. Keenan, K. Jones, and W.E. Morden.** An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta. *Lancet* 348: 303-305, 1996.
163. **Hingorani, K., A. Szebeni, and M.O. Olson.** Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J.Biol.Chem.* 275: 24451-24457, 2000.
164. **Hodgkin, A.L. and R.D. Keynes.** Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*. *J.Physiol.* 128: 28-60, 1955.
165. **Hoffmann, E.K. and L.O. Simonsen.** Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol.Rev.* 69: 315-382, 1989.
166. **Horisberger, J.D., V. Lemas, J.P. Kraehenbuhl, and B.C. Rossier.** Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu.Rev.Physiol.* 53: 565-584, 1991.
167. **Huang, B.S., E. Harmsen, H. Yu, and F.H. Leenen.** Brain ouabain-like activity and the sympathoexcitatory and pressor effects of central sodium in rats. *Circ.Res.* 71: 1059-1066, 1992.
168. **Huang, B.S., X. Huang, E. Harmsen, and F.H. Leenen.** Chronic central versus peripheral ouabain, blood pressure, and sympathetic activity in rats. *Hypertension* 23: 1087-1090, 1994.
169. **Huang, B.S. and F.H. Leenen.** Brain 'ouabain' and desensitization of arterial baroreflex by high sodium in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 25: 372-376, 1995.
170. **Huang, B.S. and F.H. Leenen.** Both brain angiotensin II and "ouabain" contribute to sympathoexcitation and hypertension in Dahl S rats on high salt intake. *Hypertension* 32: 1028-1033, 1998.

171. **Huang, L., P. Kometiani, and Z. Xie.** Differential regulation of Na/K-ATPase alpha-subunit isoform gene expressions in cardiac myocytes by ouabain and other hypertrophic stimuli. *J.Mol.Cell Cardiol.* 29: 3157-3167, 1997.
172. **Huang, L., H. Li, and Z. Xie.** Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 29: 429-437, 1997.
173. **Hughes, F.M.J., C.D. Bortner, G.D. Purdy, and J.A. Cidlowski.** Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 272: 30567-30576, 1997.
174. **Ikeda, U., R. Hyman, T.W. Smith, and R.M. Medford.** Aldosterone-mediated regulation of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J.Biol.Chem.* 266: 12058-12066, 1991.
175. **Ikeda, U., M. Takahashi, K. Okada, T. Saito, and K. Shimada.** Regulation of Na-K-ATPase gene expression by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 267: H1295-H1302, 1994.
176. **Ikonen, E., K. Fiedler, R.G. Parton, and K. Simons.** Prohibitin, an antiproliferative protein, is localized to mitochondria. *FEBS Lett.* 358: 273-277, 1995.
177. **Imai, Y., T. Kimura, A. Murakami, N. Yajima, K. Sakamaki, and S. Yonehara.** The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398: 777-785, 1999.
178. **Inagami, T. and M. Tamura.** Purification and characterization of specific endogenous ouabainlike substance from bovine adrenal. *Am.J.Med.Sci.* 295: 400-405, 1988.
179. **Ingbar, D.H., C.B. Weeks, M. Gilmore-Hebert, E. Jacobsen, S. Duvick, R. Dowin, S.K. Savik, and J.D. Jamieson.** Developmental regulation of Na, K-ATPase in rat lung. *Am.J.Physiol.* 270: L619-L629, 1996.

180. **Intengan, H.D. and E.L. Schiffrin.** Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38: 581-587, 2001.
181. **Isaev, N.K., E.V. Stelmashook, A. Halle, C. Harms, M. Lautenschlager, M. Weih, U. Dirnagl, I.V. Victorov, and D.B. Zorov.** Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neurosci.Lett.* 283: 41-44, 2000.
182. **Ishida, Y. and T.M. Chused.** Lack of voltage sensitive potassium channels and generation of membrane potential by sodium potassium ATPase in murine T lymphocytes. *J.Immunol.* 151: 610-620, 1993.
183. **Ismail-Beigi, F.** Regulation of Na⁺,K⁺-ATPase expression by thyroid hormone. *Semin.Nephrol.* 12: 44-48, 1992.
184. **Jacob, H.J., K. Lindpaintner, S.E. Lincoln, K. Kusumi, R.K. Bunker, Y.P. Mao, D. Ganten, V.J. Dzau, and E.S. Lander.** Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67: 213-224, 1991.
185. **Jaisser, F., P. Jaunin, K. Geering, B.C. Rossier, and J.D. Horisberger.** Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *J.Gen.Physiol.* 103: 605-623, 1994.
186. **Jakobsson, E.** Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. *Am.J.Physiol.* 238: C196-C206, 1980.
187. **James, P.F., I.L. Grupp, G. Grupp, A.L. Woo, G.R. Askew, M.L. Croyle, R.A. Walsh, and J.B. Lingrel.** Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol.Cell* 3: 555-563, 1999.
188. **Jewell, E.A. and J.B. Lingrel.** Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. *J.Biol.Chem.* 266: 16925-16930, 1991.

189. **Joannidis, M., L.G. Cantley, K. Spokes, A.K. Stuart-Tilley, S.L. Alper, and F.H. Epstein.** Modulation of c-fos and egr-1 expression in the isolated perfused kidney by agents that alter tubular work. *Kidney Int.* 52: 130-139, 1997.
190. **Johnson, D.G., J.K. Schwarz, W.D. Cress, and J.R. Nevins.** Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365: 349-352, 1993.
191. **Jorgensen, P.L.** Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump. Protein structure and conformations of the pure (Na⁺ +K⁺)-ATPase. *Biochim.Biophys.Acta* 694: 27-68, 1982.
192. **Jorgensen, P.L.** Functional domains of Na,K-ATPase; conformational transitions in the alpha-subunit and ion occlusion. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 607: 89-95, 1992.
193. **Jorgensen, P.L., J.M. Nielsen, J.H. Rasmussen, and P.A. Pedersen.** Structure-function relationships based on ATP binding and cation occlusion at equilibrium in Na,K-ATPase. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 643: 79-87, 1998a.
194. **Jorgensen, P.L., J.M. Nielsen, J.H. Rasmussen, and P.A. Pedersen.** Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim.Biophys.Acta* 1365: 65-70, 1998b.
195. **Juhaszova, M. and M.P. Blaustein.** Distinct distribution of different Na⁺ pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. Physiological implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 834: 524-536, 1997a.
196. **Juhaszova, M. and M.P. Blaustein.** Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94: 1800-1805, 1997b.
197. **Kaplan, J.G.** Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annu.Rev.Physiol.* 40: 19-41, 1978.

198. **Kaplan, J.H.** Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu.Rev.Biochem.* 71: 511-535, 2002.
199. **Karlish, S.J., R. Goldshleger, and P.L. Jorgensen.** Location of Asn831 of the alpha chain of Na/K-ATPase at the cytoplasmic surface. Implication for topological models. *J.Biol.Chem.* 268: 3471-3478, 1993.
200. **Kashgarian, M., J.S. Morrow, H.G. Foellmer, A.S. Mann, C. Cianci, and T. Ardito.** Na,K-ATPase co-distributes with ankyrin and spectrin in renal tubular epithelial cells. *Prog.Clin.Biol.Res.* 268B: 245-250, 1988.
201. **Kaul, S.C., E. Duncan, T. Sugihara, R.R. Reddel, Y. Mitsui, and R. Wadhwa.** Structurally and functionally distinct mouse hsp70 family members Mot-1 and Mot-2 proteins are encoded by two alleles. *DNA Res.* 7: 229-231, 2000.
202. **Kaul, S.C., K. Taira, O.M. Pereira-Smith, and R. Wadhwa.** Mortalin: present and prospective. *Exp.Gerontol.* 37: 1157-1164, 2002.
203. **Kawamura, A., J. Guo, Y. Itagaki, C. Bell, Y. Wang, G.T.J. Hauptert, S. Magil, R.T. Gallagher, N. Berova, and K. Nakanishi.** On the structure of endogenous ouabain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 6654-6659, 1999.
204. **Kent, R.B., J.R. Emanuel, Y. Ben Neriah, R. Levenson, and D.E. Housman.** Ouabain resistance conferred by expression of the cDNA for a murine Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit. *Science* 237: 901-903, 1987.
205. **Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26: 239-257, 1972.
206. **Keryanov, S. and K.L. Gardner.** Physical mapping and characterization of the human Na,K-ATPase isoform, ATP1A4. *Gene* 292: 151-166, 2002.
207. **Keynes, R.D.** The ionic fluxes in frog muscle. *Proc.R.Soc.London Ser.B* 142: 359-382, 1954.

208. **King, F.W., A. Wawrzynow, J. Hohfeld, and M. Zylicz.** Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *EMBO J.* 20: 6297-6305, 2001.
209. **Kisters, K., E.R. Krefting, M. Barenbrock, C. Spieker, and K.H. Rahn.** Na⁺ and Mg²⁺ contents in smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* 12: 648-652, 1999.
210. **Klaassen, C.H., J.A. Fransen, H.G. Swarts, and J.J. De Pont.** Glycosylation is essential for biosynthesis of functional gastric H⁺,K⁺-ATPase in insect cells. *Biochem.J.* 321 (Pt 2): 419-424, 1997.
211. **Klimatcheva, E. and W.F. Wonderlin.** An ATP-sensitive K(+) current that regulates progression through early G1 phase of the cell cycle in MCF-7 human breast cancer cells. *J.Membr.Biol.* 171: 35-46, 1999.
212. **Klip, A., T. Ramlal, and E.J.J. Cragoe.** Insulin-induced cytoplasmic alkalization and glucose transport in muscle cells. *Am.J.Physiol.* 250: C720-C728, 1986.
213. **Kluck, R.M., M.D. Esposti, G. Perkins, C. Renken, T. Kuwana, E. Bossy-Wetzel, M. Goldberg, T. Allen, M.J. Barber, D.R. Green, and D.D. Newmeyer.** The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J.Cell Biol.* 147: 809-822, 1999.
214. **Komatsu, M., T. Sumizawa, M. Mutoh, Z.S. Chen, K. Terada, T. Furukawa, X.L. Yang, H. Gao, N. Miura, T. Sugiyama, and S. Akiyama.** Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* 60: 1312-1316, 2000.
215. **Kometiani, P., J. Li, L. Gnudi, B.B. Kahn, A. Askari, and Z. Xie.** Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 273: 15249-15256, 1998.

216. **Kometiani, P., J. Tian, J. Li, Z. Nabih, G. Gick, and Z. Xie.** Regulation of Na/K-ATPase beta1-subunit gene expression by ouabain and other hypertrophic stimuli in neonatal rat cardiac myocytes. *Mol.Cell Biochem.* 215: 65-72, 2000.
217. **Koob, R., D. Kraemer, G. Trippe, U. Aebi, and D. Drenckhahn.** Association of kidney and parotid Na⁺, K(+)-ATPase microsomes with actin and analogs of spectrin and ankyrin. *Eur.J.Cell Biol.* 53: 93-100, 1990.
218. **Kraemer, D., R. Koob, B. Friedrichs, and D. Drenckhahn.** Two novel peripheral membrane proteins, pasin 1 and pasin 2, associated with Na⁺,K(+)-ATPase in various cells and tissues. *J.Cell Biol.* 111: 2375-2383, 1990.
219. **Krushkal, J., M. Xiong, R. Ferrell, C.F. Sing, S.T. Turner, and E. Boerwinkle.** Linkage and association of adrenergic and dopamine receptor genes in the distal portion of the long arm of chromosome 5 with systolic blood pressure variation. *Hum.Mol.Genet.* 7: 1379-1383, 1998.
220. **Kuwana, T., J.J. Smith, M. Muzio, V. Dixit, D.D. Newmeyer, and S. Kornbluth.** Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J.Biol.Chem.* 273: 16589-16594, 1998.
221. **La Thangue, N.B.** E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control. *Biochem.Soc.Trans.* 24: 54-59, 1996.
222. **Lahaye, P., K.A. Tazi, J.P. Rona, O. Dellis, D. Lebrec, and R. Moreau.** Effects of protein kinase C modulators on Na⁺/K⁺ adenosine triphosphatase activity and phosphorylation in aortae from rats with cirrhosis. *Hepatology* 28: 663-669, 1998.
223. **Laitusis, A.L., M.A. Brostrom, and C.O. Brostrom.** The dynamic role of GRP78/BiP in the coordination of mRNA translation with protein processing. *J.Biol.Chem.* 274: 486-493, 1999.
224. **Lamb, J.F. and D. McCall.** Effect of prolonged ouabain treatment of Na, K, Cl and Ca concentration and fluxes in cultured human cells. *J.Physiol.* 225: 599-617, 1972.

225. **Lang, F., G.L. Busch, M. Ritter, H. Volkl, S. Waldegger, E. Gulbins, and D. Haussinger.** Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol.Rev.* 78: 247-306, 1998.
226. **Lang, F., G.L. Busch, and H. Volkl.** The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol.Biochem.* 8: 1-45, 1998.
227. **Laredo, J., J.R. Shah, Z.R. Lu, B.P. Hamilton, and J.M. Hamlyn.** Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. *Hypertension* 29: 401-407, 1997.
228. **Leaf, A.** On the mechanism of fluid exchange of tissues *in vitro*. *Biochem.J.* 62: 241-248, 1956.
229. **Lederer, W.J. and M.T. Nelson.** Sodium pump stoichiometry determined by simultaneous measurements of sodium efflux and membrane current in barnacle. *J.Physiol.* 348: 665-677, 1984.
230. **Leenen, F.H., E. Harmsen, H. Yu, and C. Ou.** Effects of dietary sodium on central and peripheral ouabain-like activity in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol.* 264: H2051-H2055, 1993.
231. **Levine, H., M.R. Trindle, and K. Moldave.** Monovalent cation requirement for the aminoacyl transfer reaction in protein synthesis. *Nature* 211: 1302-1303, 1966.
232. **Li, J., S. Yang, and T.R. Billiar.** Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation. *J.Biol.Chem.* 275: 13026-13034, 2000.
233. **Li, S., C. Eim, U. Kirch, R.E. Lang, and W. Schoner.** Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of proscillaridin A- and ouabain-immunoreactivities. *Life Sci.* 62: 1023-1033, 1998.

234. **Li, S. and E.V. Wattenberg.** Differential activation of mitogen-activated protein kinases by palytoxin and ouabain, two ligands for the Na⁺,K⁺-ATPase. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 151: 377-384, 1998.
235. **Lingham, R.B. and A.K. Sen.** Regulation of rat brain (Na⁺ +K⁺)-ATPase activity by cyclic AMP. *Biochim.Biophys.Acta* 688: 475-485, 1982.
236. **Lingrel, J.B., M.L. Croyle, A.L. Woo, and J.M. Arguello.** Ligand binding sites of Na,K-ATPase. *Acta Physiol.Scand.Suppl.* 643: 69-77, 1998.
237. **Lingrel, J.B. and T. Kuntzweiler.** Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J.Biol.Chem.* 269: 19659-19662, 1994.
238. **Liu, J., J. Tian, M. Haas, J.I. Shapiro, A. Askari, and Z. Xie.** Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J.Biol.Chem.* 275: 27838-27844, 2000.
239. **Liu, J.J., L. Peng, C.J. Bradley, A. Zulli, J. Shen, and B.F. Buxton.** Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc.Res.* 45: 729-735, 2000.
240. **Logvinenko, N.S., I. Dulubova, N. Fedosova, S.H. Larsson, A.C. Nairn, M. Esmann, P. Greengard, and A. Aperia.** Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase affects its conformational equilibrium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 9132-9137, 1996.
241. **Lowndes, J.M., M. Hokin-Neaverson, and P.J. Bertics.** Kinetics of phosphorylation of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase by protein kinase C. *Biochim.Biophys.Acta* 1052: 143-151, 1990.
242. **Lubin, M.** Intracellular potassium and macromolecular synthesis in mammalian cells. *Nature* 213: 451-453, 1967.

243. **Lucchesi, P.A. and K.J. Sweadner.** Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity. *J.Biol.Chem.* 266: 9327-9331, 1991.
244. **Lupfert, C., E. Grell, V. Pintschovius, H.J. Apell, F. Cornelius, and R.J. Clarke.** Rate limitation of the Na(+),K(+)-ATPase pump cycle. *Biophys.J.* 81: 2069-2081, 2001.
245. **Lutsenko, S. and J.H. Kaplan.** Molecular events in close proximity to the membrane associated with the binding of ligands to the Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 269: 4555-4564, 1994.
246. **Lynch, C.J., P.B. Wilson, P.F. Blackmore, and J.H. Exton.** The hormone-sensitive hepatic Na⁺-pump. Evidence for regulation by diacylglycerol and tumor promoters. *J.Biol.Chem.* 261: 14551-14556, 1986.
247. **Ma, K., K.M. Vattem, and R.C. Wek.** Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J.Biol.Chem.* 277: 18728-18735, 2002.
248. **Macknight, A.D.** Principles of cell volume regulation. *Ren.Physiol.Biochem.* 11: 114-141, 1988.
249. **Macknight, A.D. and A. Leaf.** Regulation of cellular volume. *Physiol.Rev.* 57: 510-573, 1977.
250. **Majno, G. and I. Joris.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am.J.Pathol.* 146: 3-15, 1995.
251. **Malik, N., V.A. Canfield, M.C. Beckers, P. Gros, and R. Levenson.** Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. *J.Biol.Chem.* 271: 22754-22758, 1996.
252. **Manunta, P., C. Barlassina, and G. Bianchi.** Adducin in essential hypertension. *FEBS Lett.* 430: 41-44, 1998.

253. **Manunta, P., E. Messaggio, C. Ballabeni, M.T. Sciarrone, C. Lanzani, M. Ferrandi, J.M. Hamlyn, D. Cusi, F. Galletti, and G. Bianchi.** Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension. *Hypertension* 38: 198-203, 2001.
254. **Manunta, P., A.C. Rogowski, B.P. Hamilton, and J.M. Hamlyn.** Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J.Hypertens.* 12: 549-560, 1994.
255. **Manunta, P., P. Stella, R. Rivera, D. Ciurlino, D. Cusi, M. Ferrandi, J.M. Hamlyn, and G. Bianchi.** Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor in essential hypertension. *Hypertension* 34: 450-456, 1999.
256. **Marakhova, I.I., T.A. Vinogradova, and F.V. Toropova.** Na/K-pump and the cell response to mitogenic signal: regulatory mechanisms and relation to the blast transformation of human blood lymphocytes. *Membr.Cell Biol.* 14: 253-261, 2000.
257. **Marette, A., J. Krischer, L. Lavoie, C. Ackerley, J.L. Carpentier, and A. Klip.** Insulin increases the Na(+)-K(+)-ATPase alpha 2-subunit in the surface of rat skeletal muscle: morphological evidence. *Am.J.Physiol.* 265: C1716-C1722, 1993.
258. **Marsigliante, S., A. Muscella, M.G. Elia, S. Greco, and C. Storelli.** Angiotensin II AT1 receptor stimulates Na(+)-K(+)ATPase activity through a pathway involving PKC-zeta in rat thyroid cells. *J.Physiol.* 546: 461-470, 2003.
259. **Martin-Vasallo, P., W. Dackowski, J.R. Emanuel, and R. Levenson.** Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. *J.Biol.Chem.* 264: 4613-4618, 1989.
260. **Martinez, J.R., N. Cassity, and S. Barker.** Differential effects of prostaglandins and isoproterenol on cAMP content and Na, K pump activity in rat submandibular acini. *Experientia* 43: 1013-1015, 1987.

261. **Martinou, I., S. Desagher, R. Eskes, B. Antonsson, E. Andre, S. Fakan, and J.C. Martinou.** The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J.Cell Biol.* 144: 883-889, 1999.
262. **Mayhew, E. and C. Levinson.** Reversibility of ouabain induced inhibition of cell division and cation transport in Ehrlich ascites cells. *J.Cell Physiol.* 72: 73-75, 1968.
263. **McGeoch, J.E. and A.D. Morielli.** An insulin-sensitive cation channel controls $[Na^+]_i$ via $[Ca^{2+}]_o$ -regulated Na^+ and Ca^{2+} entry. *Mol.Biol.Cell* 5: 485-496, 1994.
264. **Medford, R.M., R. Hyman, M. Ahmad, J.C. Allen, T.A. Pressley, P.D. Allen, and B. Nadal-Ginard.** Vascular smooth muscle expresses a truncated Na^+ , K^+ -ATPase alpha-1 subunit isoform. *J.Biol.Chem.* 266: 18308-18312, 1991.
265. **Mellor, H. and P.J. Parker.** The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* 332 (Pt 2): 281-292, 1998.
266. **Melzi, M.L., A. Bertorello, Y. Fukuda, I. Muldin, F. Sereni, and A. Aperia.** Na,K -ATPase activity in renal tubule cells from Milan hypertensive rats. *Am.J.Hypertens.* 2: 563-566, 1989.
267. **Middleton, J.P., W.A. Khan, G. Collinsworth, Y.A. Hannun, and R.M. Medford.** Heterogeneity of protein kinase C-mediated rapid regulation of Na/K -ATPase in kidney epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 268: 15958-15964, 1993.
268. **Milanick, M.A. and J.F. Hoffman.** Ion transport and volume regulation in red blood cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 488: 174-186, 1986.
269. **Miyake, H., I. Hara, S. Arakawa, and S. Kamidono.** Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells. *J.Cell Biochem.* 77: 396-408, 2000.

270. **Mobasheri, A., J. Avila, I. Cozar-Castellano, M.D. Brownleader, M. Trevan, M.J. Francis, J.F. Lamb, and P. Martin-Vasallo.** Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci.Rep.* 20: 51-91, 2000.
271. **Mobasheri, A., A.C. Hall, J.P. Urban, S.J. France, and A.L. Smith.** Immunologic and autoradiographic localisation of the Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase in articular cartilage: upregulation in response to changes in extracellular Na⁺ concentration. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29: 649-657, 1997.
272. **Mobasheri, A., D. Oukrif, S.P. Dawodu, M. Sinha, P. Greenwell, D. Stewart, M.B. Djamgoz, C.S. Foster, P. Martin-Vasallo, and R. Mobasheri.** Isoforms of Na⁺, K⁺-ATPase in human prostate; specificity of expression and apical membrane polarization. *Histol.Histopathol.* 16: 141-154, 2001.
273. **Mohammadi, K., P. Kometiani, Z. Xie, and A. Askari.** Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J.Biol.Chem.* 276: 42050-42056, 2001.
274. **Moller, J.V., B. Juul, and M. le Maire.** Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim.Biophys.Acta* 1286: 1-51, 1996.
275. **Mongin, A.A., S.L. Aksentsev, S.N. Orlov, N.G. Slepko, M.V. Kozlova, G.V. Maximov, and S.V. Konev.** Swelling-induced K⁺ influx in cultured primary astrocytes. *Brain Res.* 655: 110-114, 1994.
276. **Mongin, A.A. and S.N. Orlov.** Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiology.* 8: 77-88, 2001.
277. **Morgan, J.R., K. Prasad, S. Jin, G.J. Augustine, and E.M. Lafer.** Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin. *Neuron* 32: 289-300, 2001.

278. **Morrow, J.S., C.D. Cianci, T. Ardito, A.S. Mann, and M. Kashgarian.** Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na,K-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells. *J.Cell Biol.* 108: 455-465, 1989.
279. **Muller-Ehmsen, J., P. Juvvadi, C.B. Thompson, L. Tumyan, M. Croyle, J.B. Lingrel, R.H. Schwinger, A.A. McDonough, and R.A. Farley.** Ouabain and substrate affinities of human Na(+)-K(+)-ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 281: C1355-C1364, 2001.
280. **Mulvany, M.J.** Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol.Sci.* 17: 105-109, 2002.
281. **Munzer, J.S., S.E. Daly, E.A. Jewell-Motz, J.B. Lingrel, and R. Blostein.** Tissue- and isoform-specific kinetic behavior of the Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 269: 16668-16676, 1994.
282. **Murata, Y., T. Matsuda, K. Tamada, R. Hosoi, S. Asano, K. Takuma, K. Tanaka, and A. Baba.** Ouabain-induced cell proliferation in cultured rat astrocytes. *Jpn.J.Pharmacol.* 72: 347-353, 1996.
283. **Muscella, A., F. Aloisi, S. Marsigliante, and G. Levi.** Angiotensin II modulates the activity of Na⁺,K⁺-ATPase in cultured rat astrocytes via the AT1 receptor and protein kinase C-delta activation. *J.Neurochem.* 74: 1325-1331, 2000.
284. **Muto, S., J. Nemoto, K. Okada, Y. Miyata, K. Kawakami, T. Saito, and Y. Asano.** Intracellular Na⁺ directly modulates Na⁺,K⁺-ATPase gene expression in normal rat kidney epithelial cells. *Kidney Int.* 57: 1617-1635, 2000.
285. **Nakagawa, Y., E.F. Petricoin, H. Akai, P.M. Grimley, B. Rupp, and A.C. Lerner.** Interferon-alpha-induced gene expression: evidence for a selective effect of ouabain on activation of the ISGF3 transcription complex. *Virology* 190: 210-220, 1992.

286. **Nakagawa, Y., V. Rivera, and A.C. Larner.** A role for the Na/K-ATPase in the control of human c-fos and c-jun transcription. *J.Biol.Chem.* 267: 8785-8788, 1992.
287. **Nelson, W.J. and P.J. Veshnock.** Ankyrin binding to (Na⁺ + K⁺)ATPase and implications for the organization of membrane domains in polarized cells. *Nature* 328: 533-536, 1987.
288. **Nielsen, O.B. and K. Overgaard.** Ion gradients and contractility in skeletal muscle: the role of active Na⁺, K⁺ transport. *Acta Physiol.Scand.* 156: 247-256, 1996.
289. **Nobel, C.S., J.K. Aronson, D.J. van den Dobbelen, and A.F. Slater.** Inhibition of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. *Apoptosis.* 5: 153-163, 2000.
290. **Numazawa, S., N. Inoue, H. Nakura, T. Sugiyama, E. Fujino, M. Shinoki, T. Yoshida, and Y. Kuroiwa.** A cardiotoxic steroid bufalin-induced differentiation of THP-1 cells. Involvement of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase inhibition in the early changes in proto-oncogene expression. *Biochem.Pharmacol.* 52: 321-329, 1996.
291. **Nunez, G., M.A. Benedict, Y. Hu, and N. Inohara.** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245, 1998.
292. **Oguchi, A., U. Ikeda, T. Kanbe, Y. Tsuruya, K. Yamamoto, K. Kawakami, R.M. Medford, and K. Shimada.** Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.* 265: H1167-H1172, 1993.
293. **Okuwaki, M., M. Tsujimoto, and K. Nagata.** The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol.Biol.Cell* 13: 2016-2030, 2002.
294. **Omatsu-Kanbe, M. and H. Kitasato.** Insulin stimulates the translocation of Na⁺/K⁽⁺⁾-dependent ATPase molecules from intracellular stores to the plasma membrane in frog skeletal muscle. *Biochem.J.* 272: 727-733, 1990.

295. **Ominato, M., T. Satoh, and A.I. Katz.** Regulation of Na-K-ATPase activity in the proximal tubule: role of the protein kinase C pathway and of eicosanoids. *J.Membr.Biol.* 152: 235-243, 1996.
296. **Or, E., R. Goldshleger, and S.J. Karlish.** An effect of voltage on binding of Na⁺ at the cytoplasmic surface of the Na⁽⁺⁾-K⁺ pump. *J.Biol.Chem.* 271: 2470-2477, 1996.
297. **Orlov, S.N.** Ion transport accross erythrocyte membrane: mechanisms and volume-dependent regulation. In: *Physiology and general biology reviews*, edited by T.M. Turpaev and N.K. Koltzov. Moscow: Harwood Academic Publishers GmbH, 1984, p. 1-48.
298. **Orlov, S.N., V.A. Adarichev, A.M. Devlin, N.V. Maximova, Y.L. Sun, J. Tremblay, A.F. Dominiczak, Y.V. Postnov, and P. Hamet.** Increased Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 1 activity in spontaneously hypertensive rats: lack of mutations within the coding region of NHE1. *Biochim.Biophys.Acta* 1500: 169-180, 2000.
299. **Orlov, S.N., N.C. Adragna, V.A. Adarichev, and P. Hamet.** Genetic and biochemical determinants of abnormal monovalent ion transport in primary hypertension. *Am.J.Physiol.* 276: C511-C536, 1999.
300. **Orlov, S.N., T.V. Dam, J. Tremblay, and P. Hamet.** Apoptosis in vascular smooth muscle cells: role of cell shrinkage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 221: 708-715, 1996.
301. **Orlov, S.N., T.J. Resink, J. Bernhardt, and F.R. Buhler.** Na⁽⁺⁾-K⁺ pump and Na⁽⁺⁾-K⁺ co-transport in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats: baseline activity and regulation. *J.Hypertens.* 10: 733-740, 1992.
302. **Orlov, S.N., S. Taurin, and P. Hamet.** The alpha1-Na/K pump does not mediate the involvement of ouabain in the development of hypertension in rats. *Blood Press.* 11: 56-62, 2002.

303. **Orlov, S.N., S. Taurin, N. Thorin-Trescases, N.O. Dulin, J. Tremblay, and P. Hamet.** Inversion of the intracellular Na(+)/K(+) ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle cells by induction of RNA synthesis. *Hypertension* 35: 1062-1068, 2000.
304. **Orlov, S.N., S. Taurin, J. Tremblay, and P. Hamet.** Inhibition of Na⁺,K⁺ pump affects nucleic acid synthesis and smooth muscle cell proliferation via elevation of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio: possible implication in vascular remodelling. *J.Hypertens.* 19: 1559-1565, 2001.
305. **Orlov, S.N., N. Thorin-Trescases, N.O. Dulin, T.V. Dam, M.A. Fortunato, J. Tremblay, and P. Hamet.** Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3. *Cell Death.Differ.* 6: 661-672, 1999.
306. **Orlov, S.N., N. Thorin-Trescases, S.V. Kotelevtsev, J. Tremblay, and P. Hamet.** Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J.Biol.Chem.* 274: 16545-16552, 1999.
307. **Orlov, S.N., J. Tremblay, D. deBlois, and P. Hamet.** Genetics of programmed cell death and proliferation. *Semin.Nephrol.* 22: 161-171, 2002.
308. **Orlov, S.N., J. Tremblay, and P. Hamet.** Cell volume in vascular smooth muscle is regulated by bumetanide-sensitive ion transport. *Am.J.Physiol.* 270: C1388-C1397, 1996.
309. **Orlowski, J. and J.B. Lingrel.** Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. *J.Biol.Chem.* 263: 10436-10442, 1988.
310. **Orlowski, J. and J.B. Lingrel.** Thyroid and glucocorticoid hormones regulate the expression of multiple Na,K-ATPase genes in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 265: 3462-3470, 1990.

311. **Orosz, D.E. and U. Hopfer.** Pathophysiological consequences of changes in the coupling ratio of Na,K-ATPase for renal sodium reabsorption and its implications for hypertension. *Hypertension* 27: 219-227, 1996.
312. **Overton, E.** Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nerven-Physiologie. II Über die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels. *Pflügers Archv.* 92: 346-386, 19020.
313. **Palasis, M., T.A. Kuntzweiler, J.M. Arguello, and J.B. Lingrel.** Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J.Biol.Chem.* 271: 14176-14182, 1996.
314. **Palmgren, M.G. and K.B. Axelsen.** Evolution of P-type ATPases. *Biochim.Biophys.Acta* 1365: 37-45, 1998.
315. **Parenti, P., M. Villa, G.M. Hanozet, M. Ferrandi, and P. Ferrari.** Increased Na pump activity in the kidney cortex of the Milan hypertensive rat strain. *FEBS Lett.* 290: 200-204, 1991.
316. **Parvathenani, L.K., E.S. Buescher, E. Chacon-Cruz, and S.J. Beebe.** Type I cAMP-dependent protein kinase delays apoptosis in human neutrophils at a site upstream of caspase-3. *J.Biol.Chem.* 273: 6736-6743, 1998.
317. **Pathak, B.G., D.G. Pugh, and J.B. Lingrel.** Characterization of the 5'-flanking region of the human and rat Na,K-ATPase alpha 3 gene. *Genomics* 8: 641-647, 1990.
318. **Pchejetski, D., S. Taurin, S. Der Sarkissian, O.D. Lopina, A.V. Pshezhetsky, J. Tremblay, D. deBlois, P. Hamet, and S.N. Orlov.** Inhibition of Na⁺, K⁺ ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 351: 735-744, 20030.
319. **Pedemont, C.H. and A.M. Bertorello.** Short-term regulation of the proximal tubule Na⁺,K⁺-ATPase: increased/decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity mediated by protein kinase C isoforms. *J.Bioenerg.Biomembr.* 33: 439-447, 2001.

320. **Peng, L., P. Martin-Vasallo, and K.J. Sweadner.** Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. *J.Neurosci.* 17: 3488-3502, 1997.
321. **Peng, M., L. Huang, Z. Xie, W.H. Huang, and A. Askari.** Partial inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain induces the Ca²⁺-dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 271: 10372-10378, 1996.
322. **Peterson, G.L., R.D. Ewing, S.R. Hootman, and F.P. Conte.** Large scale partial purification and molecular and kinetic properties of the (Na + K)-activated adenosine triphosphatase from *Artemia salina* nauplii. *J.Biol.Chem.* 253: 4762-4770, 1978.
323. **Pierdomenico, S.D., A. Bucci, P. Manunta, R. Rivera, M. Ferrandi, J.M. Hamlyn, D. Lapenna, F. Cuccurullo, and A. Mezzetti.** Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension. *Am.J.Hypertens.* 14: 44-50, 2001.
324. **Pinto, d.O.P., A.V. Chibalin, A.I. Katz, P. Soares-da-Silva, and A.M. Bertorello.** Short-term vs. sustained inhibition of proximal tubule Na,K-ATPase activity by dopamine: cellular mechanisms. *Clin.Exp.Hypertens.* 19: 73-86, 1997.
325. **Pintschovius, J., K. Fendler, and E. Bamberg.** Charge translocation by the Na⁺/K⁺-ATPase investigated on solid supported membranes: cytoplasmic cation binding and release. *Biophys.J.* 76: 827-836, 1999.
326. **Polte, T. and H. Schroder.** Cyclic AMP mediates endothelial protection by nitric oxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 251: 460-465, 1998.
327. **Pontiggia, L., K. Winterhalter, and S.M. Gloor.** Inhibition of Na,K-ATPase activity by cGMP is isoform-specific in brain endothelial cells. *FEBS Lett.* 436: 466-470, 1998.

328. **Post, R.L. and P.C. Jolly.** The linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane. *Biochim.Biophys.Acta* 25: 118-128, 1957.
329. **Post, R.L. and S. Kume.** Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* 248: 6993-7000, 1973.
330. **Post, R.L., C.R. Merritt, C.R. Kinsolving, and C.D. Albright.** Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. *J.Biol.Chem.* 235: 1796-1802, 1960.
331. **Powis, D.A.** Failure of calcium to stimulate Na,K-ATPase in the presence of EDTA. *Experientia* 41: 1048-1051, 1985.
332. **Powis, D.A., T.A. Anderson, H. Jackson, and G.D. Wattus.** Stimulation of neuronal Na^+ , K^+ -ATPase by calcium. *Biochem.Pharmacol.* 32: 1219-1227, 1983.
333. **Prasad, K.V., A. Severini, and J.G. Kaplan.** Sodium ion influx in proliferating lymphocytes: an early component of the mitogenic signal. *Arch.Biochem.Biophys.* 252: 515-525, 1987.
334. **Pressley, L. and J.W. Funder.** Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa. *Endocrinology* 97: 588-596, 1975.
335. **Pressley, T.A., F. Ismail-Beigi, G.G. Gick, and I.S. Edelman.** Increased abundance of Na^+ - K^+ -ATPase mRNAs in response to low external K^+ . *Am.J.Physiol.* 255: C252-C260, 1988.
336. **Price, E.M., D.A. Rice, and J.B. Lingrel.** Site-directed mutagenesis of a conserved, extracellular aspartic acid residue affects the ouabain sensitivity of sheep Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 264: 21902-21906, 1989.

337. **Priestland, R.N. and R. Whittam.** The temperature dependence of activation by phosphatidylserine of the sodium pump adenosine triphosphatase. *J.Physiol.* 220: 353-361, 1972.
338. **Pu, H.X., R. Scanzano, and R. Blostein.** Distinct regulatory effects of the Na,K-ATPase gamma subunit. *J.Biol.Chem.* 277: 20270-20276, 2002.
339. **Qin, X., B. Liu, and G. Gick.** Low external K⁺ regulates Na,K-ATPase alpha 1 and beta 1 gene expression in rat cardiac myocytes. *Am.J.Hypertens.* 7: 96-99, 1994.
340. **Qin, X.Q., D.M. Livingston, W.G.J. Kaelin, and P.D. Adams.** Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 10918-10922, 1994.
341. **Rajasekaran, S.A., L.G. Palmer, S.Y. Moon, S.A. Peralta, G.L. Apodaca, J.F. Harper, Y. Zheng, and A.K. Rajasekaran.** Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol.Biol.Cell* 12: 3717-3732, 2001.
342. **Rakowski, R.F., F. Bezanilla, P. De Weer, D.C. Gadsby, M. Holmgren, and J. Wagg.** Charge translocation by the Na/K pump. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 834: 231-243, 1997.
343. **Ran, Q., R. Wadhwa, R. Kawai, S.C. Kaul, R.N. Sifers, R.J. Bick, J.R. Smith, and O.M. Pereira-Smith.** Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 275: 174-179, 2000.
344. **Rapp, J.P. and H. Dene.** Failure of alleles at the Na⁺, K(+) -ATPase alpha 1 locus to cosegregate with blood pressure in Dahl rats. *J.Hypertens.* 8: 457-462, 1990.
345. **Ringer, S.** Regarding the influence of the organic constituents of the blood on the contractility of the ventricle. *J.Physiol.* 6: 361-381, 1885.

346. **Rizzoni, D., L. Rodella, E. Porteri, R. Rezzani, D. Guelfi, A. Piccoli, M. Castellano, M.L. Muiesan, R. Bianchi, and E.A. Rosei.** Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* 18: 885-891, 2000.
347. **Rostovtseva, T. and M. Colombini.** VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys.J.* 72: 1954-1962, 1997.
348. **Rudnick, G.** Bioenergetics of neurotransmitter transport. *J.Bioenerg.Biomembr.* 30: 173-185, 1998.
349. **Ruiz-Opazo, N., J.F. Cloix, M.G. Melis, X.H. Xiang, and V.L. Herrera.** Characterization of a sodium-response transcriptional mechanism. *Hypertension* 30: 191-198, 1997.
350. **Ruiz, A., S.P. Bhat, and D. Bok.** Characterization and quantification of full-length and truncated Na,K-ATPase alpha 1 and beta 1 RNA transcripts expressed in human retinal pigment epithelium. *Gene* 155: 179-184, 1995.
351. **Sachs, J.R.** The order of addition of sodium and release of potassium at the inside of the sodium pump of the human red cell. *J.Physiol.* 381: 149-168, 1986.
352. **Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99, 1998.
353. **Sakahira, H. and S. Nagata.** Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J.Biol.Chem.* 277: 3364-3370, 2002.
354. **Samani, N.J., D. Gauguier, M. Vincent, M.A. Kaiser, M.T. Bihoreau, D. Lodwick, R. Wallis, V. Parent, P. Kimber, F. Rattray, J.R. Thompson, J. Sassard, and M. Lathrop.** Analysis of quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosomes 2 and 13. Age-related differences in effect. *Hypertension* 28: 1118-1122, 1996.

355. **Sargeant, R.J., Z. Liu, and A. Klip.** Action of insulin on Na(+)-K(+)-ATPase and the Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter in 3T3-L1 adipocytes. *Am.J.Physiol.* 269: C217-C225, 1995.
356. **Satoh, T., H.T. Cohen, and A.I. Katz.** Different mechanisms of renal Na-K-ATPase regulation by protein kinases in proximal and distal nephron. *Am.J.Physiol.* 265: F399-F405, 1993a.
357. **Satoh, T., H.T. Cohen, and A.I. Katz.** Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids. *J.Clin.Invest.* 91: 409-415, 1993b.
358. **Schatzmann, H.J.** Herzglycoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport Durch die Erythrocyten-membran. *Helv.Physiol.Acta* 11: 346-354, 1953.
359. **Schneeberger, A. and H.J. Apell.** Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: I. Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. *J.Membr.Biol.* 168: 221-228, 1999.
360. **Schneeberger, A. and H.J. Apell.** Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: II. Competition of various cations. *J.Membr.Biol.* 179: 263-273, 2001.
361. **Schneider, B.G., A.W. Shyjan, and R. Levenson.** Co-localization and polarized distribution of Na,K-ATPase alpha 3 and beta 2 subunits in photoreceptor cells. *J.Histochem.Cytochem.* 39: 507-517, 1991.
362. **Schneider, R., V. Wray, M. Nimtz, W.D. Lehmann, U. Kirch, R. Antolovic, and W. Schoner.** Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J.Biol.Chem.* 273: 784-792, 1998.
363. **Schoner, W.** Endogenous cardiotoxic steroids. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le.-grand.)* 47: 273-280, 2001.

364. **Schoner, W.** Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur.J.Biochem.* 269: 2440-2448, 2002.
365. **Schwarzer, C., S. Barnikol-Watanabe, F.P. Thinnes, and N. Hilschmann.** Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 34: 1059-1070, 2002.
366. **Sciorati, C., P. Rovere, M. Ferrarini, S. Heltai, A.A. Manfredi, and E. Clementi.** Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gammadelta T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 272: 23211-23215, 1997.
367. **Segall, L., S.E. Daly, and R. Blostein.** Mechanistic basis for kinetic differences between the rat alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms of the Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 276: 31535-31541, 2001.
368. **Sejersted, O.M. and G. Sjogaard.** Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol.Rev.* 80: 1411-1481, 2000.
369. **Shahedi, M., K. Laborde, L. Bussieres, and C. Sachs.** Acute and early effects of aldosterone on Na-K-ATPase activity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 264: F1021-F1026, 1993.
370. **Shamraj, O.I. and J.B. Lingrel.** A putative fourth Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 12952-12956, 1994.
371. **Shan, X., H. Luo, H. Chen, P. Daloz, G. St-Louis, and J. Wu.** The effect of rapamycin on c-jun expression in human lymphocytes. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 69: 314-317, 1993.
372. **Shank, B.B. and N.E. Smith.** Regulation of cellular growth by sodium pump activity. *J.Cell Physiol.* 87: 377-387, 1976.

373. Shimizu, S., Y. Matsuoka, Y. Shinohara, Y. Yoneda, and Y. Tsujimoto. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J.Cell Biol.* 152: 237-250, 2001.
374. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487, 1999.
375. Shimizu, S. and Y. Tsujimoto. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97: 577-582, 2000.
376. Shull, M.M. and J.B. Lingrel. Multiple genes encode the human Na⁺,K⁺-ATPase catalytic subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84: 4039-4043, 1987.
377. Shyjan, A.W., V. Cena, D.C. Klein, and R. Levenson. Differential expression and enzymatic properties of the Na⁺,K(+)-ATPase alpha 3 isoenzyme in rat pineal glands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 1178-1182, 1990.
378. Shyjan, A.W., C. Gottardi, and R. Levenson. The Na,K-ATPase beta 2 subunit is expressed in rat brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *J.Biol.Chem.* 265: 5166-5169, 1990.
379. Skou, J.C. The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. *Biochim.Biophys.Acta* 23: 394-401, 1957.
380. Skou, J.C. Preparation from mamalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na⁺ and K⁺. *Biochim.Biophys.Acta* 58: 314-325, 1962.
381. Skou, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol.Rev.* 45: 596-617, 1965.

382. **Skou, J.C.** Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci.Rep.* 18: 155-169, 1998.
383. **Soltoff, S.P. and L.J. Mandel.** Active ion transport in the renal proximal tubule. II. Ionic dependence of the Na pump. *J.Gen.Physiol.* 84: 623-642, 1984.
384. **Stoll, M., A.W.J. Cowley, P.J. Tonellato, A.S. Greene, M.L. Kaldunski, R.J. Roman, P. Dumas, N.J. Schork, Z. Wang, and H.J. Jacob.** A genomic-systems biology map for cardiovascular function. *Science* 294: 1723-1726, 2001.
385. **Strom, D.K., J.L. Cleveland, S. Chellappan, J. Nip, and S.W. Hiebert.** E2F-1 and E2F-3 are functionally distinct in their ability to promote myeloid cell cycle progression and block granulocyte differentiation. *Cell Growth Differ.* 9: 59-69, 1998.
386. **Suzuki, K., T. Tadakuma, and H. Kizaki.** Modulation of thymocyte apoptosis by isoproterenol and prostaglandin E2. *Cell Immunol.* 134: 235-240, 1991.
387. **Sweadner, K.J.** Two molecular forms of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J.Biol.Chem.* 254: 6060-6067, 1979.
388. **Sweadner, K.J.** Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity, and ion transport stoichiometry. *J.Biol.Chem.* 260: 11508-11513, 1985.
389. **Sweadner, K.J.** Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim.Biophys.Acta* 988: 185-220, 1989.
390. **Sweadner, K.J. and C. Donnet.** Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2⁺)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem.J.* 356: 685-704, 2001.
391. **Sweeney, G. and A. Klip.** Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol.Cell Biochem.* 182: 121-133, 1998.

392. **Szamel, M. and K. Resch.** Inhibition of lymphocyte activation by ouabain. Interference with the early activation of membrane phospholipid metabolism. *Biochim.Biophys.Acta* 647: 297-301, 1981.
393. **Szebeni, A., J.E. Herrera, and M.O. Olson.** Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34: 8037-8042, 1995.
394. **Szebeni, A. and M.O. Olson.** Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci.* 8: 905-912, 1999.
395. **Szent-Györgyi, A.** *Chemical Physiology of Contraction.* In: *in Body and Heart Muscle*, edited by Academic Press. New York: 1953, p. 86-91.
396. **Takeyasu, K., H. Okamura, J.C. Yasuhara, Y. Ogita, and S.H. Yoshimura.** P-type ATPase diversity and evolution: the origins of ouabain sensitivity and subunit assembly. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le.-grand.)* 47: 325-333, 2001.
397. **Tang, M.J. and A.A. McDonough.** Low K⁺ increases Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase alpha- and beta-subunit mRNA and protein abundance in cultured renal proximal tubule cells. *Am.J.Physiol.* 263: C436-C4421992.
398. **Therien, A.G. and R. Blostein.** K⁽⁺⁾/Na⁽⁺⁾ antagonism at cytoplasmic sites of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase: a tissue-specific mechanism of sodium pump regulation. *Am.J.Physiol.* 277: C891-C8981999.
399. **Therien, A.G. and R. Blostein.** Mechanisms of sodium pump regulation. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 279: C541-C5662000.
400. **Therien, A.G., R. Goldshleger, S.J. Karlish, and R. Blostein.** Tissue-specific distribution and modulatory role of the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 272: 32628-32634, 1997.

401. **Therien, A.G., S.J. Karlish, and R. Blostein.** Expression and functional role of the gamma subunit of the Na, K-ATPase in mammalian cells. *J.Biol.Chem.* 274: 12252-12256, 1999.
402. **Therien, A.G., N.B. Nestor, W.J. Ball, and R. Blostein.** Tissue-specific versus isoform-specific differences in cation activation kinetics of the Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 271: 7104-7112, 1996.
403. **Therien, A.G., H.X. Pu, S.J. Karlish, and R. Blostein.** Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. *J.Bioenerg.Biomembr.* 33: 407-414, 2001.
404. **Thomas, R.C.** Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol.Rev.* 52: 563-594, 1972.
405. **Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik.** Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316, 1998.
406. **Tirupattur, P.R., J.L. Ram, P.R. Standley, and J.R. Sowers.** Regulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase gene expression by insulin in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Hypertens.* 6: 626-629, 1993.
407. **Tomaszewski, M., N.J. Brain, F.J. Charchar, W.Y. Wang, B. Lacka, S. Padmanabahn, J.S. Clark, N.H. Anderson, H.V. Edwards, E. Zukowska-Szzechowska, W. Grzeszczak, and A.F. Dominiczak.** Essential hypertension and beta2-adrenergic receptor gene: linkage and association analysis. *Hypertension* 40: 286-291, 2002.
408. **Tripodi, G., F. Valtorta, L. Torielli, E. Chierigatti, S. Salardi, L. Trusolino, A. Menegon, P. Ferrari, P.C. Marchisio, and G. Bianchi.** Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J.Clin.Invest.* 97: 2815-2822, 1996.

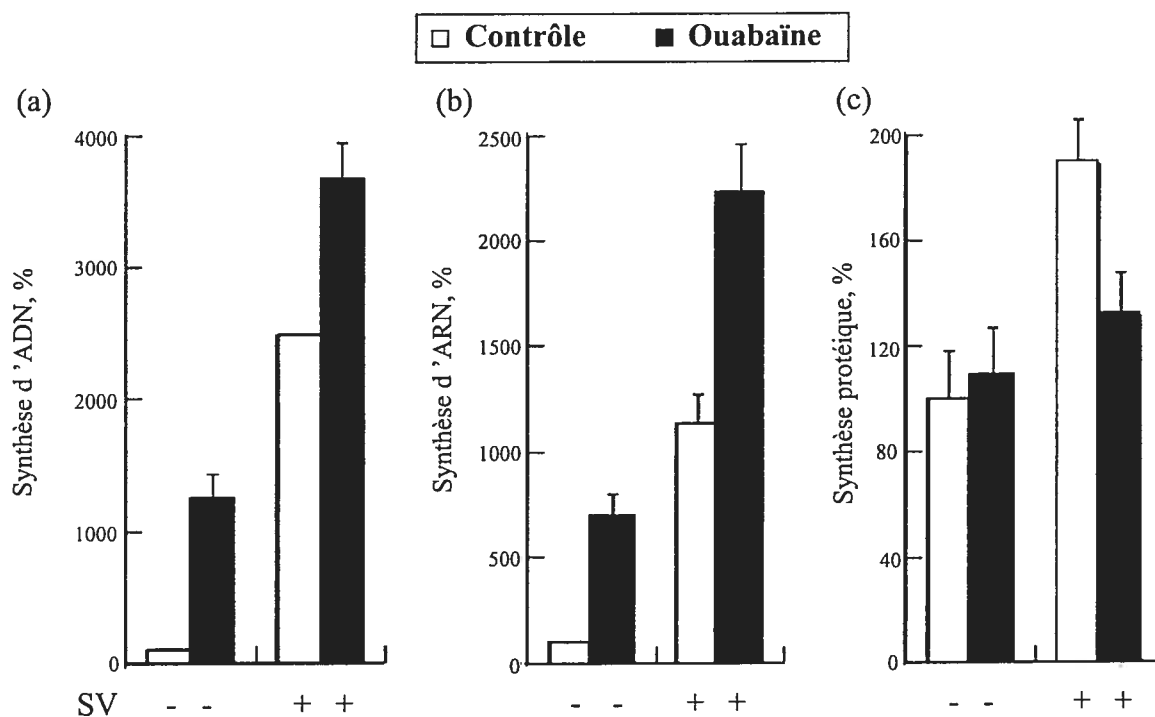
409. **Trotier, D. and K.B. Doving.** Direct influence of the sodium pump on the membrane potential of vomeronasal chemoreceptor neurones in frog. *J.Physiol.* 490 (Pt 3): 611-621, 1996.
410. **Uchida, S., H.M. Kwon, A. Yamauchi, A.S. Preston, F. Marumo, and J.S. Handler.** Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 8230-8234, 1992.
411. **Uchida, S., A. Yamauchi, A.S. Preston, H.M. Kwon, and J.S. Handler.** Medium tonicity regulates expression of the Na(+)- and Cl(-)-dependent betaine transporter in Madin-Darby canine kidney cells by increasing transcription of the transporter gene. *J.Clin.Invest.* 91: 1604-1607, 1993.
412. **Venosa, R.A.** Hypo-osmotic stimulation of active Na⁺ transport in frog muscle: apparent upregulation of Na⁺ pumps. *J.Membr.Biol.* 120: 97-104, 1991.
413. **Verbeke, P., J. Fonager, B.F. Clark, and S.I. Rattan.** Heat shock response and ageing: mechanisms and applications. *Cell Biol.Int.* 25: 845-857, 1993.
414. **Verrey, F., J.P. Kraehenbuhl, and B.C. Rossier.** Aldosterone induces a rapid increase in the rate of Na,K-ATPase gene transcription in cultured kidney cells. *Mol.Endocrinol.* 3: 1369-1376, 1989.
415. **Vizi, E.S.** Na⁺-K⁺-activated adenosinetriphosphatase as a trigger in transmitter release. *Neuroscience* 3: 367-384, 1978.
416. **Wadhwa, R., K. Taira, and S.C. Kaul.** An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress.Chaperones.* 7: 309-316, 2002.
417. **Wadhwa, R., S. Takano, M. Robert, A. Yoshida, H. Nomura, R.R. Reddel, Y. Mitsui, and S.C. Kaul.** Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J.Biol.Chem.* 273: 29586-29591, 1998.

418. **Wadhwa, R., T. Yaguchi, M.K. Hasan, Y. Mitsui, R.R. Reddel, and S.C. Kaul.** Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp.Cell Res.* 274: 246-253, 2002.
419. **Walev, I., K. Reske, M. Palmer, A. Valeva, and S. Bhakdi.** Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J.* 14: 1607-1614, 1995.
420. **Wall, S.M.** Ammonium transport and the role of the Na,K-ATPase. *Miner.Electrolyte Metab.* 22: 311-317, 1996.
421. **Wang, S., N. Nath, M. Adlam, and S. Chellappan.** Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18: 3501-3510, 1999.
422. **Wang, S., N. Nath, G. Fusaro, and S. Chellappan.** Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol.Cell Biol.* 19: 7447-7460, 1999.
423. **Wang, S., B. Zhang, and D.V. Faller.** Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *EMBO J.* 21: 3019-3028, 2002.
424. **Webster, C.R., P. Usechak, and M.S. Anwer.** cAMP inhibits bile acid-induced apoptosis by blocking caspase activation and cytochrome c release. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 283: G727-G7382002.
425. **Wellman, G.C., L. Cartin, D.M. Eckman, A.S. Stevenson, C.M. Saundry, W.J. Lederer, and M.T. Nelson.** Membrane depolarization, elevated Ca(2+) entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 281: H2559-H25672001.
426. **Wilson, T.H.** Ionic permeability and osmotic swelling. *Science* 120: 104-105, 1954.
427. **Woo, A.L., P.F. James, and J.B. Lingrel.** Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 275: 20693-20699, 2000.

428. **Xia, P., R.M. Kramer, and G.L. King.** Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J.Clin.Invest.* 96: 733-740, 1995.
429. **Xie, Z., P. Kometiani, J. Liu, J. Li, J.I. Shapiro, and A. Askari.** Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 274: 19323-19328, 1999.
430. **Yamada, K., A. Goto, C. Hui, N. Yagi, H. Nagoshi, M. Sasabe, and T. Sugimoto.** Role of ouabainlike compound in rats with reduced renal mass-saline hypertension. *Am.J.Physiol.* 266: H1357-H1362, 1994.
431. **Yamamoto, K., U. Ikeda, K. Okada, T. Saito, K. Kawakami, and K. Shimada.** Sodium ion mediated regulation of Na/K-ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc.Res.* 28: 957-962, 1994.
432. **Yamori, Y., T. Igawa, T. Kanbe, M. Kihara, Y. Nara, and R. Horie.** Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin.Sci.(Lond.)* 61 Suppl 7: 121s-123s, 1981.
433. **Yang-Feng, T.L., J.W. Schneider, V. Lindgren, M.M. Shull, E.J.J. Benz, J.B. Lingrel, and U. Francke.** Chromosomal localization of human Na⁺, K⁺-ATPase alpha- and beta-subunit genes. *Genomics* 2: 128-138, 1988.
434. **Yao, H., R.D. York, A. Misra-Press, D.W. Carr, and P.J. Stork.** The cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (PKA) is required for the sustained activation of mitogen-activated kinases and gene expression by nerve growth factor. *J.Biol.Chem.* 273: 8240-8247, 1998.
435. **Yingst, D.R.** Modulation of the Na,K-ATPase by Ca and intracellular proteins. *Annu.Rev.Physiol.* 50: 291-303, 1988.

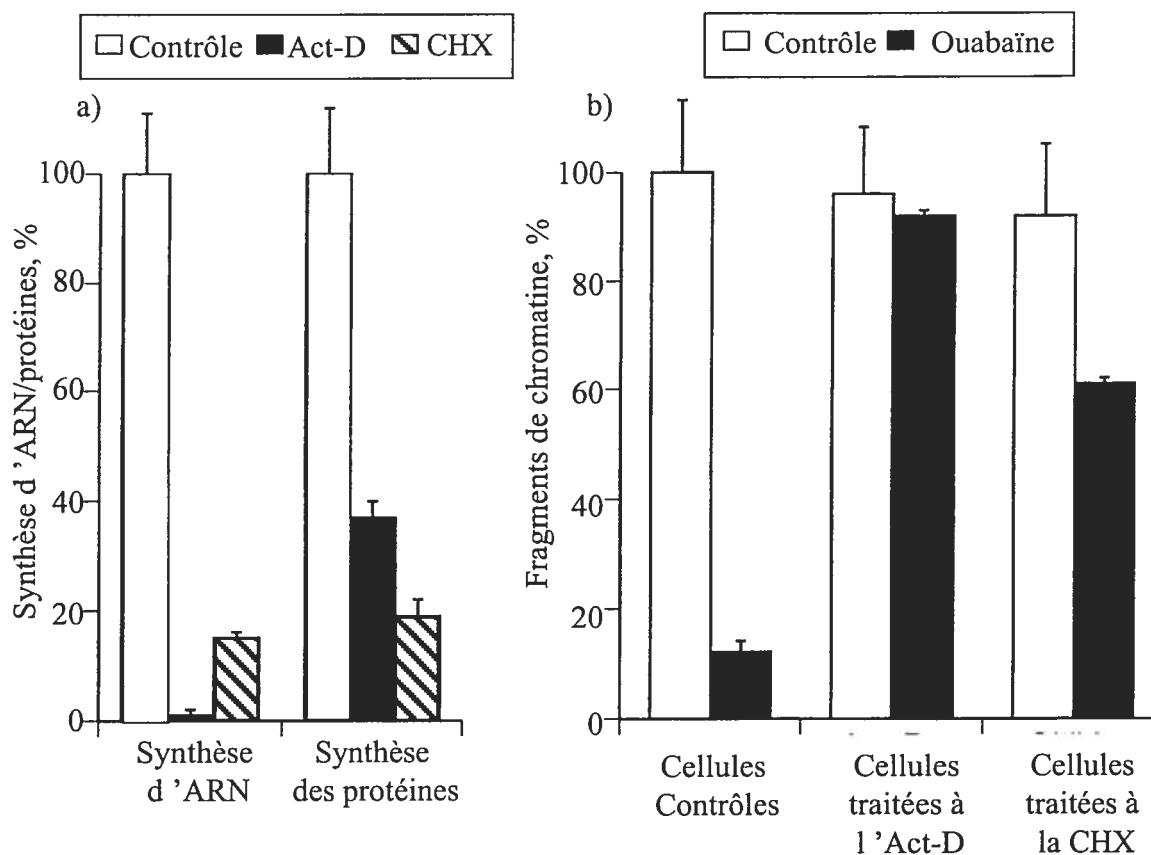
436. **Yingst, D.R., J. Davis, and R. Schiebinger.** Inhibitors of tyrosine phosphatases block angiotensin II inhibition of Na(+) pump. *Eur.J.Pharmacol.* 406: 49-52, 2000.
437. **Yoda, A. and S. Yoda.** Interaction between ouabain and the phosphorylated intermediate of Na,K-ATPase. *Mol.Pharmacol.* 22: 700-705, 1982.
438. **Young, J.C., I. Moarefi, and F.U. Hartl.** Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J.Cell Biol.* 154: 267-273, 2001.
439. **Young, R.M. and J.B. Lingrel.** Tissue distribution of mRNAs encoding the alpha isoforms and beta subunit of rat Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 145: 52-58, 1987.
440. **Yu, C., Z. Xie, A. Askari, and N.N. Modyanov.** Enzymatic properties of human Na,K-ATPase alpha1beta3 isozyme. *Arch.Biochem.Biophys.* 345: 143-149, 1997.
441. **Zhang, Z., P. Devarajan, A.L. Dorfman, and J.S. Morrow.** Structure of the ankyrin-binding domain of alpha-Na,K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 273: 18681-18684, 1998.
442. **Zhao, N., L.C. Lo, N. Berova, K. Nakanishi, A.A. Tymiak, J.H. Ludens, and G.T.J. Haupt.** Na,K-ATPase inhibitors from bovine hypothalamus and human plasma are different from ouabain: nanogram scale CD structural analysis. *Biochemistry* 34: 9893-9896, 1995.
443. **Zhou, X., G. Jiang, A. Zhao, T. Bondeva, P. Hirszel, and T. Balla.** Inhibition of Na,K-ATPase activates PI3 kinase and inhibits apoptosis in LLC-PK1 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 285: 46-51, 2001.
444. **Zhuang, Y., C. Wendt, and G. Gick.** Regulation of Na,K-ATPase beta 1 subunit gene transcription by low external potassium in cardiac myocytes. Role of Sp1 AND Sp3. *J.Biol.Chem.* 275: 24173-24184, 2000.
445. **Zylicz, M., F.W. King, and A. Wawrzynow.** Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J.* 20: 4634-4638, 2001.

ANNEXE I



Effet de la ouabaine et du sérum de veau (SV) sur la synthèse d'ARN, d'ADN et des protéines. Les CMLV quiescentes sont incubées pendant 24 h en l'absence ou en présence de 10% de SV et de 1mM de ouabaine. Pour mesurer la synthèse d'ARN, d'ADN et des protéines, [³H]-thymidine, [³H]-uridine et [³H]-leucine sont ajoutées pour les 2 dernières heures d'incubation. Les valeurs obtenues en absence de SV et de ouabaine sont considérées comme 100%. Les moyennes \pm erreurs standards sont données à partir d'expériences réalisées en quadruplicata. Avec la permission de Sergei. N. Orlov et al, *Journal of Hypertension* 2001; 19:1559-1565 © Lippincott Williams & Wilkins

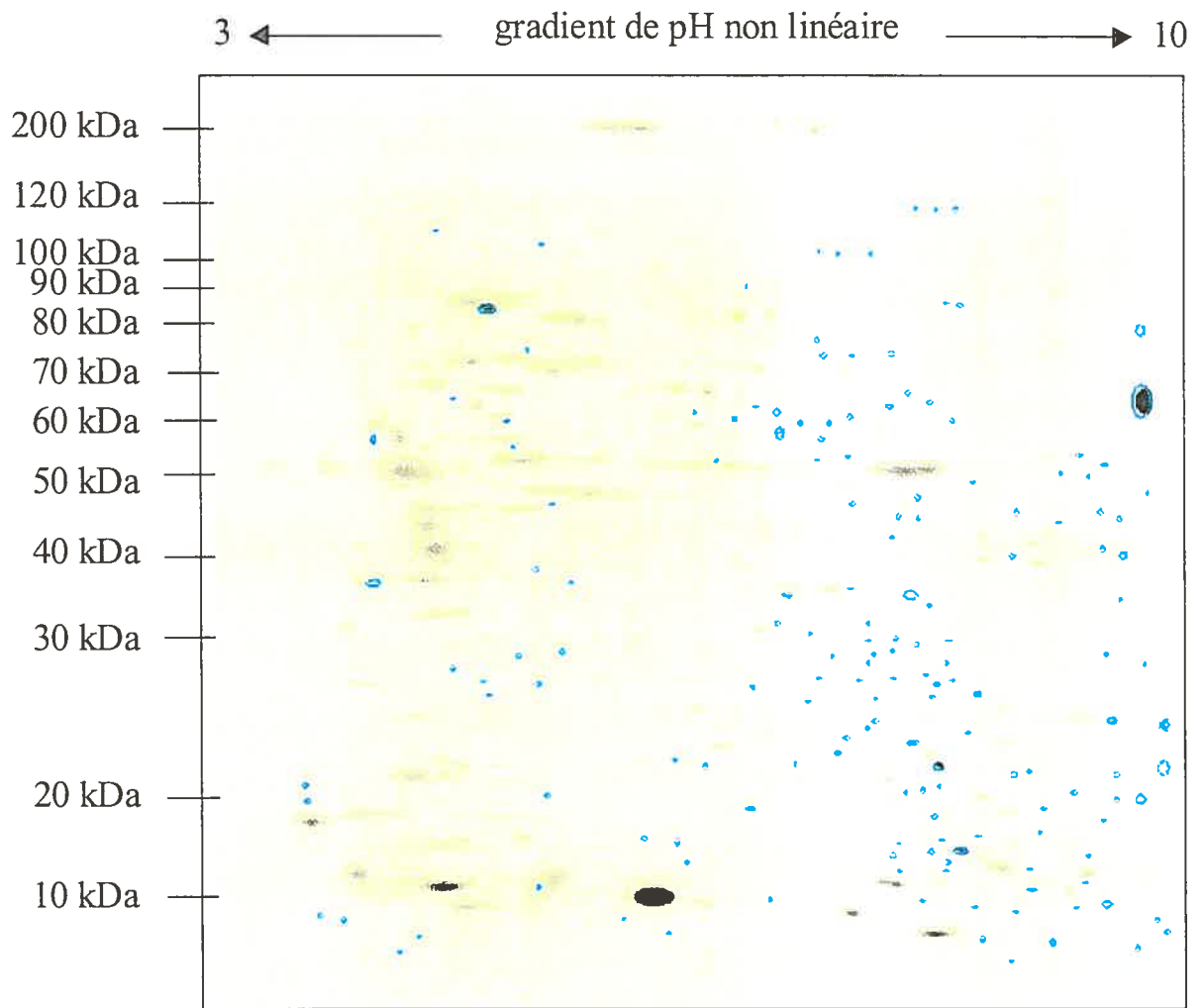
ANNEXE II



Effet de l'actinomycine D (Act, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de la cycloheximide (CHX, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sur la synthèse d'ARN et des protéines (a), et sur l'apoptose dans les CMLV-E1A (b). a, les cellules sont préincubées 30 min dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau (SV) avec ou sans inhibiteurs; l' $[^3\text{H}]$ -uridine ou la $[^3\text{H}]$ -leucine est ensuite ajoutée pour 2 heures additionnelles pour estimer le synthèse d'ARN ou des protéines. Les valeurs de l'incorporation de $[^3\text{H}]$ -uridine ou $[^3\text{H}]$ -leucine en l'absence d'inhibiteurs sont considérées comme 100%. Les moyennes \pm erreurs standards sont données à partir d'expériences réalisées en quadruplicata. b, les cellules sont préincubées 30 min dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau (SV) avec ou sans actinomycine D ou cycloheximide puis 2 heures en présence de ouabaïne. Le milieu est ensuite aspiré, les cellules sont lavées avec du DMEM puis incubées pendant 3 heures dans un milieu DMEM sans SV en présence d'actinomycine D, de cycloheximide et de ouabaïne comme indiqué. L'augmentation des fragments de chromatine par la déprivation du sérum dans les cellules contrôles est considérée comme 100%. Les moyennes \pm erreurs standards sont données à partir d'expériences réalisées en quadruplicata.

Avec la permission de Sergei. N. Orlov et al, *Hypertension* 2000, 35:1062-1068 © Lippincott Williams & Wilkins

ANNEXE III

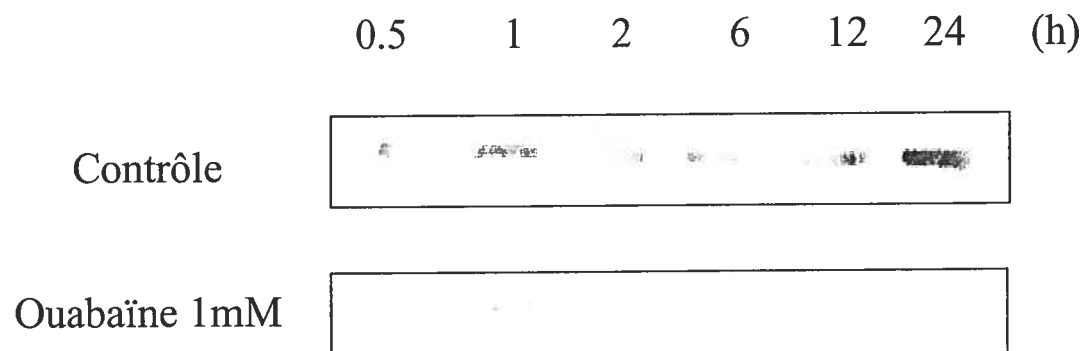


Protéines apparaissant après 3 h d'incubation en présence de ouabaine 1 mM dans des cellules de muscle lisse vasculaire BN.lx dans un milieu dépourvu de sérum.

Les protéines sont marquées avec la méthionine ^{35}S et les protéines néosynthétisées sont visualisées par autoradiographie et représentées en bleu.

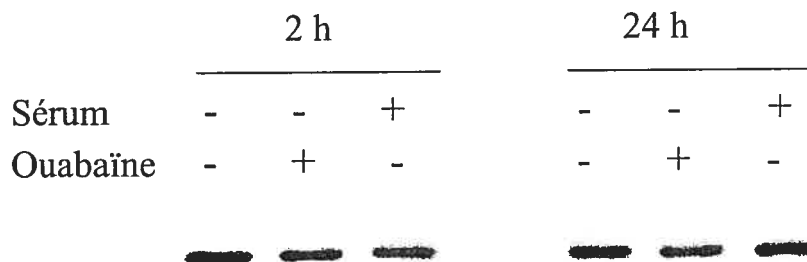
ANNEXE IV

Expression de Hsp70



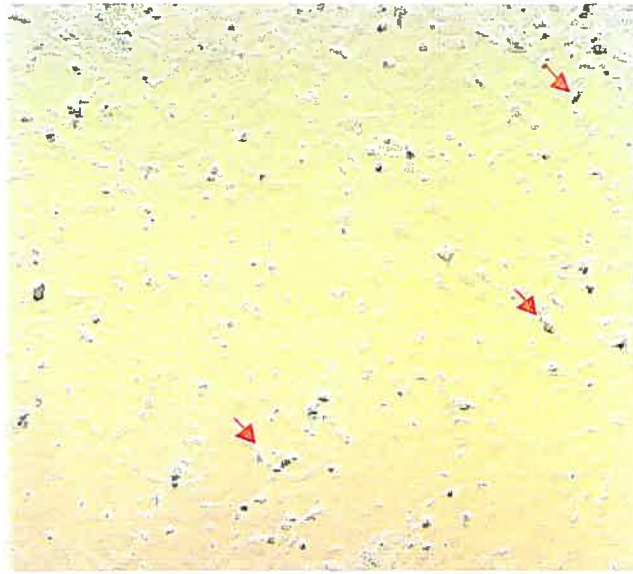
Immunobuvardage représentant l'effet de 1 mM de ouabaïne sur l'expression de la protéine Hsp70 dans des CMLV de rat incubées en l'absence de sérum.

Expression de Hsp27

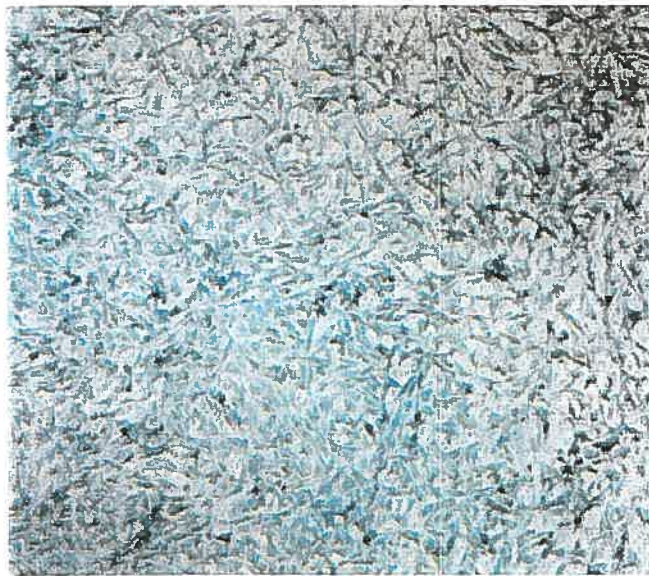


Immunobuvardage représentant l'effet de 1 mM de ouabaïne sur l'expression de la protéine Hsp27 dans des CMLV de rat incubées en l'absence ou en présence de sérum pendant 2 h et 24 h.

ANNEXE V



CMLV BN. 1x



CMLV- E1A

Comparaison de l'efficacité de transfection entre des cellules de muscle lisse vasculaire BN 1x (CMLV BN.1x) et des cellules de muscle lisse vasculaire transfectées par la protéine E1A (CMLV E1A) en utilisant la β -galactosidase comme gène rapporteur.

