

# L'Effet Pathologique du Monoxyde d'Azote est Diminué dans les Myocytes Cardiaques Hypertrophiés

Par  
Viviane El-Helou

Département de Physiologie  
Faculté de Médecine  
Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
En vue de l'obtention  
du degré de Maîtrise en Physiologie

**Avril 2004**



LU

4

U58

2004

V.080

**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 :

L'Effet Pathologique du Monoxyde d'Azote  
est Diminué dans Les Myocytes Cardiaques  
Hypertrophiés

Présentée par : Viviane El-Helou

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Angelino Calderone  
Directeur de recherche

Dr Madhu Anand-Srivastava  
Président rapporteur

Dr Michèle Brochu  
Membre du jury

## Résumé

L'hypertrophie cardiaque est une réponse adaptative associée à une balance dynamique entre des facteurs hypertrophiques et anti-hypertrophiques. Le NO, un régulateur potentiel du remodelage cardiaque, est défini comme une molécule anti-hypertrophique et anti-proliférative. Le but principal de cette étude est d'investiguer si l'action antiproliférative du NO est maintenue dans le myocyte cardiaque ainsi que le mécanisme impliqué. De plus, cette étude détermine la capacité de la réponse hypertrophique de moduler l'action antiproliférative du NO. L'effet du NO est évalué par le donneur S-Nitroso-N-acétylpenicillamine (SNAP). Pour étudier la conséquence de l'hypertrophie, cette dernière est induite par un traitement de 24h avec la norépinéphrine ou l'endothéline-1. La stimulation des myocytes cardiaques de rats nouveaux-nés pour 24h avec SNAP provoque une diminution dose dépendante de l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -Thymidine avec un effet maximal observé à 100  $\mu\text{M}$  ( $59 \pm 5\%$  ↓). Le peroxy-nitrite, une molécule cytotoxique, est formé suite à une réaction entre le NO et l'anion superoxide. Ainsi, en catalysant la réaction entre deux superoxides, le superoxide dismutase mimétique MnTBAP empêche la formation du peroxy-nitrite et inhibe la diminution de la synthèse d'ADN par SNAP. Ceci suggère que cette diminution de la synthèse d'ADN se fait par le peroxy-nitrite. L'induction de l'hypertrophie avec des prétraitements de la norépinéphrine ou l'endothéline-1 inhibe la diminution de la synthèse d'ADN SNAP dépendante. En

conclusion, le traitement avec SNAP diminue la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés. Par contre, l'hypertrophie du myocyte cardiaque confère un mécanisme physiologique protecteur qui oppose l'action pathologique du NO.

Mots clés : myocyte cardiaque, monoxyde d'azote, oxyde nitrique synthase, hypertrophie, synthèse d'ADN, superoxide dismutase, peroxyde nitrite.

## Abstract

Cardiac remodelling represents a dynamic balance between hypertrophic and anti-hypertrophic factors. Nitric Oxide (NO) has been defined as a potent growth-suppressing and anti-hypertrophic molecule. Thus, the following study determined whether the growth-suppressing effect of NO was sustained in the cardiac myocyte. Moreover, we tested the hypothesis that the hypertrophic cardiac myocyte negatively influenced the latter action of NO. The effect of NO was evaluated using S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) as a NO donor. In order to study the effect of hypertrophy, rat neonatal cardiac myocytes were treated for 24h with either norepinephrine or endothelin-1. In neonatal rat cardiac myocytes, a 24h treatment with SNAP caused a marked dose-dependent decrease of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation with a maximal effect observed at 100  $\mu\text{M}$  ( $59\pm 5\%$  ↓). The reaction between NO and a superoxide anion produces peroxynitrite, a toxic molecule. The superoxide dismutase mimetic MnTBAP, which catalyse the reaction between two superoxides, prevented the formation of peroxynitrite and inhibited SNAP dependent decrease in DNA synthesis. Therefore, these data suggested the implication of peroxynitrite pathway in the inhibiting mechanism of NO. In the hypertrophic cardiac myocyte, the SNAP-mediated inhibition of DNA synthesis was partially decreased. In summary, the treatment of cardiac myocytes with SNAP decreased DNA

synthesis. However, the hypertrophic cardiac myocyte was refractory to SNAP, thereby highlighting an important physiological protective mechanism of hypertrophy counteracting the pathological actions of NO.

**Key words:** cardiac myocyte, nitric oxide, nitric oxide synthase, hypertrophy, DNA synthesis, superoxide dismutase, peroxynitrite.

# Table des Matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES</b> .....	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XV</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1. LE MONOXYDE D'AZOTE .....	2
1.1 HISTORIQUE .....	2
1.2 STRUCTURE, SYNTHÈSE ET DÉGRADATION DU NO .....	3
2. LES SYNTHASES DU MONOXYDE D'AZOTE .....	6
2.1 STRUCTURE .....	6
2.2 INHIBITEURS DE NOS .....	9
2.3 ISOFORMES : EXPRESSION, RÉGULATION ET LOCALISATION .....	9
2.3.1 eNOS .....	11
2.3.2 nNOS .....	15
2.3.3 iNOS .....	16
3. LES CIBLES MOLÉCULAIRES DU NO .....	19
3.1 VOIE DE SIGNALISATION DÉPENDANTE DU GMP CYCLIQUE .....	19
3.2 VOIES DE SIGNALISATION INDÉPENDANTES DU GMP CYCLIQUE .....	22
4. LES SUPEROXIDES DISMUTASES .....	24
5. LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES DU NO DANS LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE .....	27
5.1 Débit sanguin .....	27
5.2 Fonction cardiaque .....	28
5.3 Croissance cellulaire .....	30
6. LES EFFETS PATHOLOGIQUES DU NO DANS LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE .....	31
6.1 Infarctus myocardique .....	31
6.2 Apoptose des Myocytes Cardiaques .....	33
6.2.1 Apoptose et Remodelage Cardiaque .....	33
6.2.2 Mécanismes Attribués à l'Apoptose .....	35
6.2.3 Rôle du NO dans l'Apoptose .....	36
7. FIBROSE RÉPARATIVE VERSUS FIBROSE RÉACTIVE .....	37
8. HYPERTROPHIE CARDIAQUE .....	41
8.1 Mécanismes de Développement de l'Hypertrophie Cardiaque .....	42
8.1.1 Hypertrophie Cardiaque Concentrique versus Eccentrique .....	42
8.1.2 Stimuli Déclencheurs de l'Hypertrophie Cardiaque .....	43
8.1.3 Phénotypes de l'Hypertrophie Cardiaque .....	46
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>48</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>50</b>
<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>59</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>87</b>

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>105</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>108</b>

# Liste des Figures

## Introduction

- Figure 1 : Structure des isoformes de NOS ( nNOS, iNOS et eNOS ).....8
- Figure 2 : Structure de la guanylate cyclase soluble.....21
- Figure 3 : Fibrose Réactive et Fibrose Réparative suite à un infarctus du myocarde.....40
- Figure 4 : Schéma de la cascade de signalisation de l' ET-1 Amenant à l'activation du promoteur de la  $\beta$ -MHC et l'induction de l'hypertrophie.....44

## Résultats

- Figure 1 : Mesure de la production du GMPc intracellulaire au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés par RIA.....61
- Figure 2 : Effet de SNAP sur l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.....62
- Figure 3 : Effet de SNAP sur la fragmentation de l'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés visualisé par la technique de TUNEL .....63
- Figure 4 : Effet de SNAP 100  $\mu$ M sur la phosphorylation de ERK et de P38 dans les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.....64
- Figure 5 : Effet d'ODQ sur la diminution de la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés causée par les doses élevées de SNAP .....69
- Figure 6 : Effet du MnTBAP sur la diminution de la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés causée par les doses élevées de SNAP.....70

Figure 7 : Effet du MnTBAP sur la phosphorylation de ERK et de P38 causée par SNAP au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.....	72
Figure 8 : Effet de NE et ET-1 sur l'incorporation de [ <sup>3</sup> H]-Thymidine ou [ <sup>3</sup> H]-Leucine au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.....	76
Figure 9 : Effet de la NE sur les filaments d'actine sarcomérique au niveau des myocytes cardiaques de nouveau-nés visualisé par marquage Texas-Red.....	77
Figure 10 : Effet de la NE ou l'ET-1 sur la réponse inhibitrice de SNAP sur la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés. ....	78
Figure 11 : Effet de la NE sur la fragmentation de l'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés observé avec SNAP 100 µM visualisé par la technique de TUNEL.....	81
Figure 12 : Effet de la NE sur la phosphorylation de ERK et de P38 causée par SNAP dans les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.....	82
Figure 13 : Niveau d'expression de la MnSOD et de iNOS dans le ventricule gauche non infarci.....	86

## Liste des abréviations, sigles et acronymes

$\alpha$  : Alpha

AC : Adénylate cyclase

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

Ach : Acétylcholine

ADN : Acide désoxyribonucléique

Alb : Albumine

AMPC : 3',5'-adenosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein kinase

Ang II : Angiotensine II

ANP : Peptide natriurétique de l'oreillette ( Atrial Natriuretic peptide )

Ap: protéine activatrice

Arg : Arginine

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BH<sub>4</sub> : Tétrahydrobioptérine

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

Ca<sup>2+</sup>/CaM : Domaine de liaison calcium /calmoduline

CaM : Calmoduline

CaM-K : Kinase dépendante de la calmoduline

Caspase : Cysteine aspartic acid specific protease

Cn : Calcineurine

Cu/Zn SOD : Cuivre/Zinc superoxide dismutase

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDRF : Endothelium-derived relaxing factor

eNOS : NOS endothéliale

ERK : Extracellular signal regulated kinase

ET-1 : Endothelin-1

FAD : Flavine adénine nucléotide

FBS : Sérum bovine fœtale

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes ( Fibroblast growth factor )

FMN : Flavine mononucléotide

GCs : Guanylate cyclase soluble

GMPc : 3',5'-guanosine monophosphate cyclique

GTP : Guanosine 5'-triphosphate

H<sub>2</sub>O : Eau

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HBSS : Hanks' Balanced Salt solution

HSP : Heat shock protein

IBMX : Isobutylméthylxanthine

ICE : IL-1 $\beta$  converting enzyme

IGF-1 : Insulin like growth factor

IL-1 : Interleukine-1

iNOS : NOS inductible

kDa : Kilo Dalton

LPS : Lipopolysaccharides

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MC : Myocyte cardiaque

MCH : Myocyte cardiaque hypertrophié

MCP-1 : Protéine chemoattractant monocytaire

MEC : Matrice extracellulaire

MHC : Myosin heavy chain

Min : Minute

MLP : Muscle LIM protein

MMPs : Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire

MnTBAP : Mn(III) tetrakis(benzoic acid) porphyrin

MnSOD : Manganese superoxide dismutase

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NE : Norépinephrine

$\eta$ M : Nano molaire

NNMC : Myocyte cardiaque de rats nouveaux-nés

nNOS : NOS neuronale

NO : Monoxyde d'azote ( Nitric oxide )

NOS : Synthase de l'oxyde nitrique ( Nitric oxide synthase )

$O_2^-$  : Superoxide

$O_2$  : Oxygène

ODQ : 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one

ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite

PARP : Poly ADP ribose polymérase

PI3-K : Phosphatidyl inositol -3 kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine Kinase GMPc dépendante

PLC-β : Phospholipase C-β

PP2A : Protéine phosphatase 2A

RPM : Rotation par minute

RS : Réticulum sarcoplasmique

RyR : Récepteurs ryanodines

SERCA : Sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase

SNAP : S ± nitroso-N-acetylpenicillamine

SOD : Superoxide dismutase

T : Température

TDT : Terminal deoxynucleotidyl transferase

TGF-β : Transforming growth factor beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End

#### Labeling

μM : Micro molaire

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VG : Ventricule gauche

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Dr Angelino Calderone, mon directeur de recherche et un grand ami, pour sa contribution précieuse au développement de mon esprit scientifique. Merci, LINO, pour votre disponibilité exceptionnelle et votre implication constante dans l'avancement de mon projet. Votre optimisme, votre encadrement et votre grande compétence scientifique me donnent vraiment le goût du dépassement. Je vous remercie aussi, sur le plan personnel et scientifique, sur les valeurs ainsi que le sens de critique que vous m'avez transmis. Je me considère privilégiée d'avoir obtenu cette magnifique et stimulante formation. Je voudrais finalement vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée, le support, les nombreux encouragements et les précieux conseils.

Un merci tout spécial pour les bons moments à mes gentils collègues Mlle Samar Bel-Hadj, Mlle Jessica Drapeau, M. Hugues Gosselin et M. Robert Clément. Je remercie spécialement le soutien de Hugues. Grâce à son expérience, son dynamisme et surtout son organisation, j'ai appris à maîtriser beaucoup de techniques. Merci Samar et Jessica pour votre belle amitié et compagnie, votre écoute et votre incroyable joie de vivre.

Je tiens également à remercier toutes les personnes à l'Institut de Cardiologie qui ont participé à mon projet dont principalement M. Louis Villeneuve et aussi l'équipe de l'audio-visuel.

Finalement, j'aimerais remercier les membres de ma famille qui m'ont soutenue aux cours de mes longues années d'études. Merci, spécialement à mon meilleur ami, mon mari Elie et ma charmante fille, Cynthia.

À mon exceptionnel mari  
dont l'amour et la confiance  
agrémentent  
le merveilleux parcours de ma vie.

A ma belle et adorable fille  
dont la naissance  
m'apporte les plus grandes joies.

# Introduction

# 1. Le Monoxyde d'Azote

## 1.1 Historique

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène, volatile et vasodilatatrice. Initialement appelé EDRF, le NO a d'abord été mis en évidence dans l'endothélium vasculaire. Sa découverte provient de certaines expériences qui ont démontré que l'acétylcholine (Ach), un vasodilatateur potentiel, ne produit pas en tout temps une vasorelaxation mais plutôt une vasoconstriction. Furchgott et Zawadzki ont montré que cette variabilité dans l'effet de l'acétylcholine est le résultat de la perte mécanique de l'endothélium qui a eu lieu de manière non intentionnel. Ainsi, l'Ach provoque la relaxation d'un vaisseau isolé lorsqu'il est intact (présence de l'endothélium). Par contre, lorsque l'endothélium vasculaire est enlevé, l'effet vasodilatateur de l'Ach est transformé en effet vasoconstricteur. Alors, il était conclu que l'effet vasodilatateur de l'Ach requiert la présence des cellules endothéliales. (Furchgott et Zawadzki, 1980) Ainsi, en agissant sur des récepteurs muscariniques présents sur ces cellules, l'Ach stimule la relâche du NO. (Palmer et al., 1987)

L'endothélium est formé d'une monocouche cellulaire qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux. Les cellules endothéliales, dont la durée de vie est estimée à 30 ans, se divisent et migrent pour tapisser une surface lésée. Elles peuvent également créer de nouveaux vaisseaux capillaires. Ce processus qui s'appelle l'angiogenèse joue un rôle important dans la

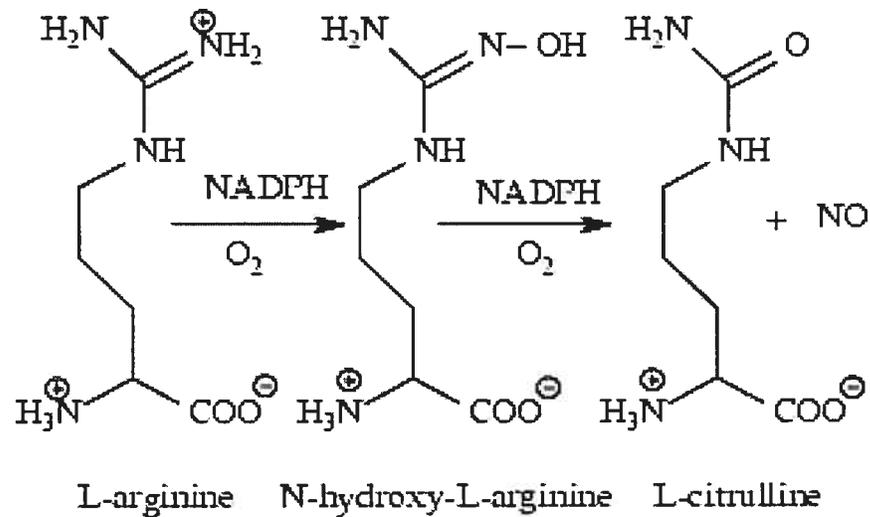
croissance tumorale. Ainsi, l'endothélium constitue une surface lisse qui réduit la friction entre le sang et la surface interne des vaisseaux. Il comporte aussi de nombreuses enzymes (ACE, la prostacycline synthase, des métalloprotéases et la NO synthase) ainsi que plusieurs récepteurs (récepteurs à l'acétylcholine, à la noradrénaline, à la sérotonine, à l'histamine et à l'angiotensine).

## 1.2 Structure, Synthèse et Dégradation du NO

Découvert en 1772 par Joseph Priestley, le monoxyde d'azote, un gaz incolore à l'état pur, est constitué d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés par une forte liaison. La molécule de NO possède deux propriétés importantes. Premièrement, c'est une molécule non chargée qui peut diffuser librement à travers la membrane. De plus, le NO possède un électron non paillé associé à l'atome d'azote le classant ainsi comme un radical libre réactif. Ceci permet à cette molécule de réagir rapidement avec l'oxygène, les autres radicaux ainsi que d'autres molécules contenant du soufre ou des métaux. (Lowenstein et al., 1994) Deuxièmement, le NO est produit par deux classes de NO synthases. D'une part, les NOS constitutives (eNOS et nNOS) qui synthétisent des quantités faibles de NO durant des courtes périodes de temps. D'une autre part, la NOS inductible (iNOS) produit des grandes quantités de NO comparativement aux NOS constitutives pour des longues périodes de temps. (Jugdutt, 2002)

Dans les cellules endothéliales, la production du NO est stimulée par les forces de cisaillement ainsi que plusieurs facteurs humoraux comme des hormones et des facteurs de croissance par exemple l'Ach, le VEGF, la bradykinine, l'oestrogène et l'angiotensine II (Ang II). (Boo et Jo, 2003) Les forces de cisaillement représentent le passage du sang dans les vaisseaux qui engendre, sur la surface de ces vaisseaux, une force de friction par unité de surface. (Barakat et Davies, 1998) Ainsi, la réponse des cellules endothéliales au flot sanguin est essentielle afin de participer à la régulation de la fonction vasculaire. Une fois que le stimulus mécanique a lieu sur la surface de la cellule endothéliale, il est transmis via des détecteurs mécaniques et induit plusieurs cascades de signalisation intracellulaire. (Mazzag et al., 2003) Il existe plusieurs détecteurs mécaniques dont les récepteurs membranaires kinases, les intégrines, les canaux ioniques ainsi que le cytosquelette. (Fisher et al., 2001)

La synthèse de ce gaz vasoactif s'effectue à partir de l'acide aminé L-arginine par une famille d'enzymes appelée oxide nitrique synthases (NOS). (Sakuma et al., 1988) Ces enzymes causent l'oxydation du groupe guanidino du L-arginine afin de libérer le NO et la L-citrulline. (Marletta et al., 1998) En présence de NADPH, d'oxygène, de fer (hème) , de FAD, de FMN et de BH<sub>4</sub>, NOS transforme l'arginine en hydroxy-L-arginine qui est ensuite transformée en L-citrulline et en NO selon la réaction suivante :



L'arginine provient d'un apport exogène, de l'alimentation ainsi que d'un renouvellement endogène. La citrulline, en présence de l'arginosuccinate synthétase et d'aspartate, est transformée en arginosuccinate, puis en fumarate et en arginine. (Koga et al., 2003) Le NO est essentiellement stocké lié à l'albumine (alb) et ceci le protège de l'oxydation. (Marley et al., 2001) L'alb nitrosylée (alb-S-NO) libère lentement le NO ou l'échange avec d'autres molécules contenant des thiols, comme la cystéine et le glutathione. (Rafikova et al., 2002) La demi vie du NO est de l'ordre de 2 à 30 secondes. Il est éliminé par les globules rouges sous forme gazeuse dans l'air exhalé et dans le sang, par oxydation ou par réaction avec l'hémoglobine pour donner du nitrate qui sera éliminé par le rein. (Goretski et Hollocher, 1988)

## 2. Les Synthèses du Monoxyde d'Azote

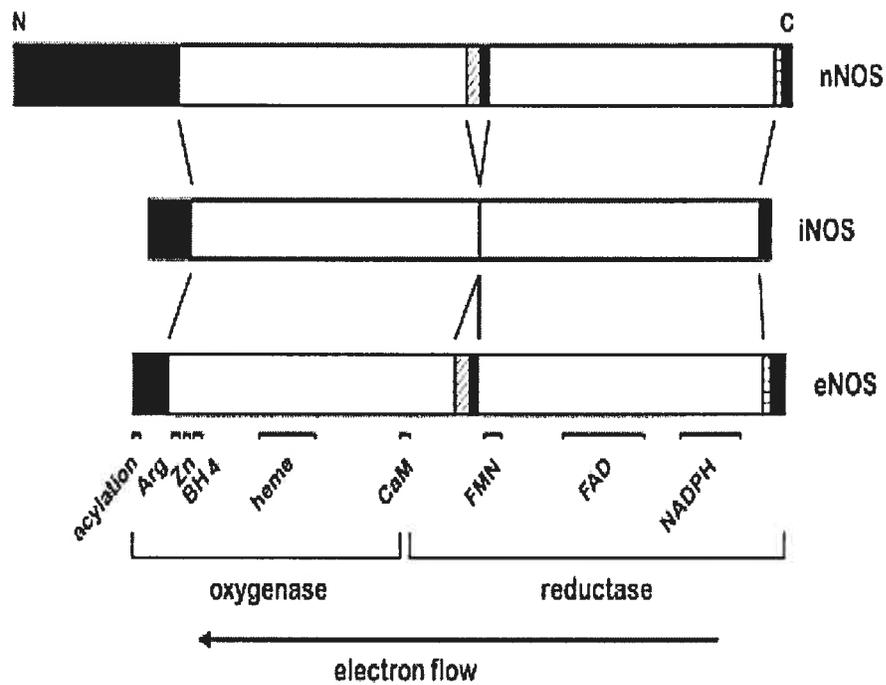
### 2.1 Structure

Les NOS ont été premièrement identifiées et décrites en 1989 et par la suite, clonées et purifiées entre 1991 et 1994. Il existe trois isoformes de NOS qui sont classés selon l'ordre et les types cellulaires où ils ont été premièrement identifiés : l'isoforme neuronal nNOS (NOS1), l'isoforme inducible iNOS (NOS2) et l'isoforme endothélial eNOS (NOS3). (Hattori et al., 1994) Ainsi, ces isoformes proviennent de gènes distincts et partagent 50 % à 60 % d'homologie dans la séquence des acides aminés. (Nathan et Xie, 1994) La distribution tissulaire et cellulaire, les fonctions biologiques ainsi que les mécanismes de régulation des ces isoformes sont différents.

Les NOS sont composées de deux monomères identiques et chaque monomère contient un domaine réductase carboxy-terminal (homologue au cytochrome P-450 réductase) et un domaine oxidase amino-terminal. (Alderton et al., 2001) Ce dernier domaine comporte des sites de liaison pour la calmoduline, l'hème, la  $BH_4$  et l'arginine. Le domaine réductase contient des sites de liaison pour la FAD, la FMN et la NADPH. La

BH<sub>4</sub> ainsi que l'arginine sont requises afin de générer de manière efficace le NO. Sous certaines conditions, NOS est découplée et peut ainsi générer du superoxide au lieu du NO. (Stroes et al., 1998) La génération du superoxide par eNOS ou nNOS se fait par le groupe hème du domaine oxygénase et elle se fait en absence de l'arginine et du BH<sub>4</sub>. (Xia et al., 1998) (Vasquez-Vivar et al., 2003) Par contre, la iNOS produit le superoxide par son domaine réductase. (Xia et al., 1998) La liaison de la calmoduline facilite le flux des électrons des groupes flavines prosthétiques présents dans le domaine réductase vers le groupe prosthétique hème présent dans le domaine oxidase. Ainsi, ceci facilite la conversion de l' O<sub>2</sub> et de la L-arginine en NO et en L-citrulline. (Abu-Soud et al., 1994) (Fig. 1; Govers et Rabelink, 2001)

**Figure 1 Structure des isoformes de NOS (nNOS, iNOS et eNOS).** Les boîtes noires montrent l'homologie existante entre les isoformes. Il y a représentation des domaines oxygénase et réductase et des régions impliquées dans l'acylation et dans la liaison des substrats ainsi que des co-facteurs. Arg, arginine; BH<sub>4</sub>, tétrahydrobioptérine; CaM, calmodulin; FMN, flavin mononucléotide; FAD, flavin adénine dinucléotide.



## 2.2 Inhibiteurs de NOS

Les principaux inhibiteurs des NOS sont des dérivés de la L-arginine qui compétitionnent avec le substrat L-arginine pour son site de liaison. Ils vont ainsi se lier au site actif et bloquer la synthèse du NO. Il existe aussi des composés qui interfèrent au niveau du site de liaison de la bioptérine tandis que d'autres agissent directement sur le site hème. De plus, récemment, il est possible de retrouver des drogues qui inhibent la dimérisation de iNOS durant sa synthèse et son assemblage. (Alderton et al., 2001)

## 2.3 Isoformes : Expression, Régulation et Localisation

Les NOS sont classées en deux catégories distinctes. La première catégorie comporte les constitutives : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3). Ces deux isoformes requiert du calcium afin de synthétiser le NO et leur expression est responsable de la synthèse des niveaux faibles de ce gaz. Cette libération de NO est immédiate et de courte durée. Ces NOS sont inactives quand elles se dissocient de leurs cofacteurs. Par contre, elles deviennent activées une fois associées aux cofacteurs ainsi qu'à la calmoduline et ce, en présence d'une concentration suffisante d'ions calcium. La deuxième catégorie est constituée de la NOS inducible qui est calcium-calmoduline indépendante et elle est responsable

de la production de grandes quantités de NO. Malgré qu'elle contient un domaine  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , le domaine calmoduline reste attaché même en présence de taux élevés de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. (Venema et al., 1996) Ainsi, la CaM est une des premières protéines identifiée comme ayant une interaction avec les NOS. Elle est essentielle afin de contrôler l'activité enzymatique de tous les isoformes car sa liaison augmente le taux de transfert des électrons de la NADPH au domaine flavine réductase et par la suite, vers le groupe hème.

De plus, la variation dans la localisation des NOS causent des différences dans le rôle de chaque isoforme. Au niveau cardiaque, la localisation subcellulaire des NOS avec certaines molécules effectrices constitue un mécanisme régulateur important de la signalisation par la molécule du monoxyde d'azote. (Barouch et al., 2002) Ainsi, la présence de eNOS au niveau de la caveolae permet sa compartimentalisation avec les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques afin d'induire l'inhibition des effets inotropiques de ces récepteurs. Par contre, la nNOS se trouve au niveau du réticulum sarcoplasmique permettant ainsi la relâche de calcium via les récepteurs ryanodines (RyR) afin de faciliter la contraction. La variabilité dans ces effets des NOS a également été confirmée par des souris déficientes en ces isoformes. (Keaney et al., 1996) (Massion et Balligand, 2003) Dans les

prochaines sections, les facteurs affectant la variabilité dans la localisation des NOS seront expliqués pour chacun des isoformes.

### 2.3.1 eNOS

Au niveau de la cellule, eNOS, une enzyme de 135 kDa, est amenée à la membrane plasmique dans des domaines spécialisés (invaginations) appelés caveolae. Ces microdomaines ont pour fonction de faciliter le transport des molécules à travers les cellules et représentent aussi des sites de compartimentalisation de plusieurs molécules impliquées dans la transduction du signal comme par exemple les protéines G. La eNOS subit une myristoylation irréversible co-translationnelle sur un résidu glycine N-terminal et une palmitoylation réversible post-translationnelle sur deux résidus cystéines. (Liu et al., 1996) D'ailleurs, c'est le seul isoforme qui subit ces modifications. La N-Myristoylation est nécessaire pour l'association de eNOS à la membrane et afin de la cibler vers le golgi tandis que la palmitoylation est importante afin de cibler eNOS dans la caveolae. Ainsi, la proximité de eNOS de la membrane lui confère la propriété d'être proche des facteurs nécessaires à son bon fonctionnement. Il a été démontré que 50 % de la totalité de eNOS est localisé au niveau de la membrane plasmique et 35 % se trouve dans l'appareil de golgi. (Sowa et al., 1999)

eNOS est abondamment exprimée au niveau de plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, le muscle cardiaque ainsi que le muscle squelettique. (Wang et al., 2001) (Govers et Rabelink, 2001) (Balligand et Cannon, 1997) L'expression constitutive de cet isoforme joue un rôle protecteur au niveau vasculaire dont la vasodilatation, l'inhibition de l'adhésion plaquettaire aux cellules endothéliales et de l'infiltration des neutrophiles. De plus, elle réduit l'expression de la protéine chemoattractant monocyttaire (MCP-1) qui est impliquée dans le recrutement durant l'athérogénèse. Le NO inhibe aussi la migration et la prolifération des cellules lisses du muscle vasculaire. (Behrendt et Ganz, 2002) Au niveau cardiaque, le NO possède un rôle fondamental dans l'homéostasie cardiovasculaire. Il régule plusieurs aspects dont la circulation coronaire et la fonction cardiaque. (Hoit, 2001) Certaines études utilisant des souris déficientes en eNOS (eNOS  $-/-$ ) ont montré une potentialisation de la réponse inotropique  $\beta$ -adrénergique suite à une stimulation avec les cathécolamines. (Massion et Balligand, 2003) De plus, ces souris eNOS $-/-$  sont hypertensives et ce, dû principalement à un défaut de régulation du tonus vasculaire. (Ortiz et Garvin, 2003)

eNOS est régulée par plusieurs processus dont principalement le NO qui constitue lui même un mécanisme régulateur négatif diminuant l'expression de eNOS par une voie GMPc dépendante. (Vaziri et Wang,

1999) Cette enzyme est aussi dotée d'un mécanisme intramoléculaire auto inhibiteur impliquant le site de liaison calmoduline. Ce blocage moléculaire est enlevé par des niveaux élevés de calcium intracellulaire. (Wu, 2002) Ainsi, la présence d'agonistes comme la bradykinine et la substance P augmente la production de NO par eNOS et ce, en augmentant le calcium intracellulaire. De plus, le passage du liquide dans les vaisseaux (forces de cisaillement) augmente l'expression de eNOS. Ce processus d'activation de eNOS est régulé par plusieurs mécanismes dont le canal potassique qui agit comme un transducteur mécano-chimique. (Ohno et al., 1993) Par contre, la production de NO par les forces de cisaillement implique d'autres mécanismes  $Ca^{2+}/CaM$  indépendants. (Boo et Jo, 2003) Certaines études ont ainsi démontré que la synthèse  $Ca^{2+}$  indépendante du NO par les forces de cisaillement peut se faire aussi par une phosphorylation PI3-K/Akt dépendante de eNOS. (Dimmeler et al., 1999) Ce mécanisme régule à la hausse l'activité catalytique de eNOS en phosphorylant le résidu sérine C-terminal (Ser-1177) de eNOS. De plus, les forces de cisaillement induisent la production de facteurs comme le NF $\kappa$ B qui ont des éléments de réponse sur le promoteur de eNOS. (Davis et al., 2003) Il est aussi intéressant de noter que la synthèse du NO est aussi stimulée par d'autres déformations cellulaires comme la compression ainsi que l'étirement. L'activité de eNOS est aussi affectée par d'autres facteurs comme sa phosphorylation sur le résidu thréonine (Thr-495) qui inhibe son activation. (Chen et al., 1999) Ainsi, dans une situation de stress ischémique ou un exercice vigoureux chez le rat, il y a activation de l'AMPK au niveau des muscles squelettiques et

cardiaques. L'activation de cette kinase phosphoryle eNOS sur le résidu Thr-495 résultant en son inhibition. Par contre, l'ANP est un facteur qui augmente l'expression de eNOS de plusieurs façons dont la suppression de la synthèse d'Ang II empêchant ainsi la régulation négative de l'ARNm de eNOS. De plus, par son récepteur NPR, l'ANP stimule l'activité de eNOS. (Calderone, 2003)

Sur le promoteur de eNOS, plusieurs éléments de réponse autres que l'élément de réponse aux forces de cisaillement sont trouvés. (Davis et al., 2003) Certains augmentent l'expression de eNOS comme l'élément de réponse à l'oestrogène (Chambliss et Shaul, 2002), à l'insuline (Fisslthaler et al., 2003) et au TGF- $\beta$ 1 (Inoue et al., 1995). Par contre, certains diminuent l'expression de eNOS comme l'élément de réponse au TNF- $\alpha$  (Neumann et al., 2003) à l'érythropoétine (Wang et al., 1999) ainsi qu'à des facteurs induits par l'hypoxie (McQuillan et al., 1994).

Finalement, plusieurs protéines interagissent avec la eNOS dont la cavéoline et la HSP 90. La localisation de eNOS dans la caveolae la rend inactive car elle est inhibée par la cavéoline-1 dans les cellules endothéliales et la cavéoline-3 dans les myocytes cardiaques. La cavéoline, une protéine membranaire palmitoylée de manière irréversible, se lie sur elle-même et forme un complexe oligomérique et interagit aussi avec eNOS. La cavéoline se dissocie de eNOS suite à l'association du complexe Ca<sup>2+</sup>/CAM avec eNOS. Ce dernier phénomène coïncide avec la dépalmitoylation de eNOS.

(Govers et Rabelink, 2001) (Ju et al., 1997) Par contre, la HSP 90 régule positivement l'activité de eNOS en interagissant directement avec cette dernière. (Takahashi et Mendelsohn, 2003) Il y a aussi augmentation de l'expression de eNOS à des niveaux transcriptionnels et ce, par une augmentation de la liaison Sp1 sur le promoteur de eNOS via l'action de la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui elle-même est activée par ERK 1 et 2. De plus, la liaison de la protéine activatrice AP-1 et AP-2 au site promoteur de eNOS augmente l'expression de eNOS. (Govers et Rabelink, 2001)

### 2.3.2 nNOS

L'enzyme nNOS, ayant un poids moléculaire d'environ 160 kDa, est principalement exprimée dans le système nerveux central, les muscles squelettiques et cardiaques. (Xu et al., 1999) Chez l'humain, cet isoforme est également exprimé au niveau du pancréas, de l'estomac, des poumons et de l'utérus. (Kingwell, 2000) Sa présence dans les tissus cardiaques spécialisés de la conduction ainsi que dans les terminaisons nerveuses sympathiques lui donnent un rôle important dans la relâche ainsi que dans la recapture des cathécolamines. La nNOS est localisée au niveau du RS. La localisation de cette enzyme près d'une source calcique suggère que le NO dérivé de cette dernière régule la relaxation musculaire en exerçant une action spécifique et localisée. (Sears et al., 2003)

In vitro, la phosphorylation de nNOS par certaines protéines kinases ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM dépendante, AMPc dépendante, GMPc dépendante et PKC) cause une diminution de son activité enzymatique. Par contre, sa déphosphorylation par la calcineurine stimule son activité. (Balligand et Cannon, 1997) De plus, l'activité de la nNOS est inhibée par la cavéoline-3 et également par sa phosphorylation sur le résidu sérine 847 par la CAM-K. (Komeima et al., 2000) (Venema et al., 1997) Par contre, in vivo, il a été démontré que l'activité catalytique de nNOS est stimulée suite à son interaction avec la protéine Hsp 90. (Bender et al., 1999) (Song et al., 2001)

### 2.3.3 iNOS

La NOS inductible, une protéine de 130 kDa, est responsable de la production de grandes quantités de NO. Elle est aussi retrouvée dans plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes cardiaques, les myocytes cardiaques adultes et néonataux ainsi que les cellules de l'endocarde, de l'endothélium et du muscle lisse vasculaire. Son domaine CaM lié de façon intrinsèque lui permet de devenir entièrement actif une fois exprimée dans les cellules. Son expression est induite dans les macrophages, les hépatocytes ainsi que dans le muscle lisse vasculaire en réponse à la présence de certaines molécules impliquées dans la défense immunitaire et la réaction inflammatoire comme les cytokines, le  $\text{TNF-}\alpha$  ainsi que l'endotoxine

lipopolysaccharide LPS. (Daniliuc et al., 2003) (Lida et al., 1992) (Perrella et al., 1994) De plus, l'activation de l'Ang II, des PKC et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques causent l'expression de iNOS dans les myocytes cardiaques. Par contre, le TGF- $\beta$  diminue l'expression de iNOS dans les cellules endothéliales, les myocytes cardiaques et les cellules du muscle lisse vasculaire. (Balligand et Cannon, 1997) D'ailleurs, dans les myocytes cardiaques, l'aldostérone inhibe l'induction de iNOS par l'IL-1 par un mécanisme dépendant du TGF- $\beta$ . (Chun et al., 2003) De plus, la synthèse de NO par iNOS est modulée par son interaction avec la protéine HSP 90. (Yoshida et Xia, 2003)

L'isoforme iNOS est exprimé dans plusieurs conditions pathologiques et pathophysiologiques comme le choc septique, l'insuffisance cardiaque, la dysfonction myocardique ainsi que la réponse inflammatoire systémique. (Mungrue et al., 2002) (Sam et al., 2001) De plus, il est connu que durant le rejet d'une greffe cardiaque, il y a une induction importante de l'ARNm, de la protéine ainsi que de l'activité enzymatique de iNOS dans les cellules endothéliales, les myocytes cardiaques et les macrophages infiltrés dans le myocarde. (Szabolcs et al., 1996) Plusieurs études démontrent qu'une augmentation de l'activité de iNOS est associée à une atténuation de la réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. (Jugdutt, 2002) Le NO généré en grande quantité par cet isoforme est impliqué dans l'apoptose de plusieurs types cellulaires. Par contre, son inhibition chronique, in vivo, engendre

l'hypertrophie cardiaque ainsi que l'épaississement de la vasculature coronarienne. (Hoit, 2001)

Il a été démontré que iNOS ne joue pas un rôle important ni dans la détermination de la taille de l'infarctus ni dans le remodelage précoce du ventricule gauche. Par contre, durant le remodelage tardif, iNOS contribue à la diminution de la fonction contractile et augmente l'apoptose des myocytes. (Xi et al., 1999) Contrairement à ces dernières recherches, d'autres études montrent un rôle important pour iNOS dans l'augmentation de la taille de l'infarctus. (Wang et al., 1999) De plus, l'utilisation de souris transgéniques déficientes en iNOS révèle que, suite à un infarctus du myocarde, il y a une réduction du taux de mortalité qui serait associée à une amélioration de la fonction cardiaque ainsi qu'une réduction de l'apoptose des myocytes. (Ortiz et Garvin, 2003) Par conséquent, le rôle de iNOS dans la pathophysiologie de l'infarctus reste controversé.

### 3. Les Cibles Moléculaires du NO

Les effets biologiques du NO sont modulés par plusieurs facteurs principalement par les quantités de NO produites et l'état oxydatif du milieu. De plus, le nombre ainsi que la vitesse de réaction des cibles moléculaires à proximité du site de synthèse du NO affectent la réponse de cette molécule. Le NO agit par différentes voies de signalisation appelées les voies GMPc dépendantes et indépendantes. Au niveau cardiaque, l'activation des voies GMPc dépendante joue un rôle majoritaire dans le fonctionnement normal de cet organe ainsi que dans la cardioprotection. Par contre, à des concentrations élevées de NO, cette molécule devient potentiellement toxique via l'activation d'une signalisation GMPc indépendante qui repose en grande partie sur la production du peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ).

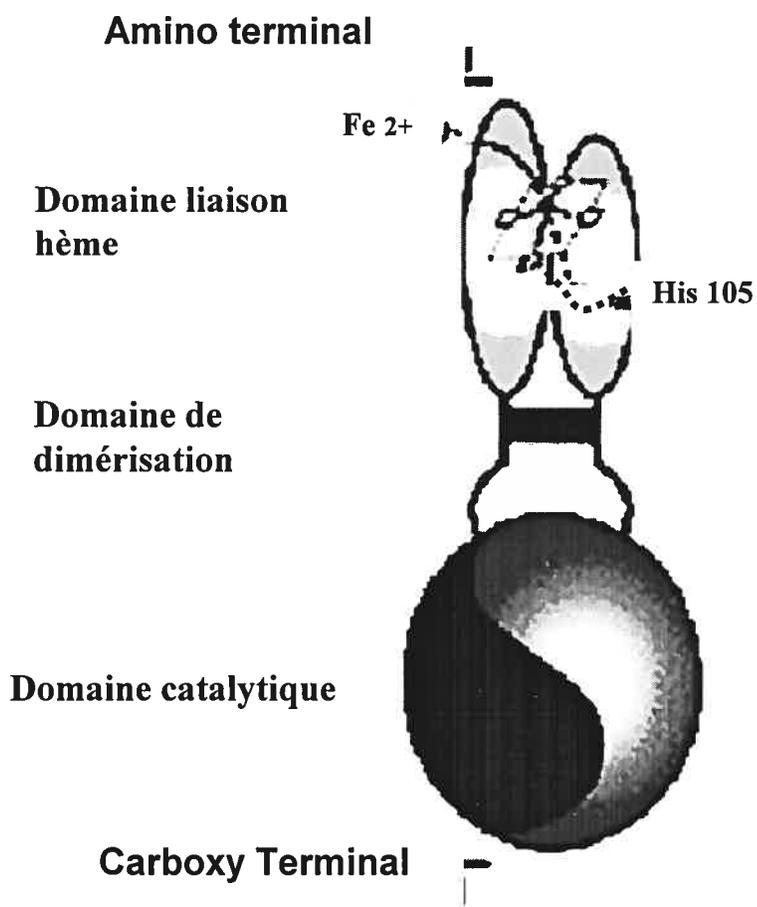
#### 3.1 Voie de signalisation dépendante du GMP cyclique

Une des cibles prédominantes du NO est le hème de la guanylate cyclase soluble. L'interaction du NO avec cette dernière provoque un changement conformationnel aboutissant à l'activation de cette enzyme. La GCs est une enzyme cytosolique de forme hétérodimérique composée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . (Kamisaki et al., 1986) (Fig. 2 ; Lucas et al., 2000) L'expression des deux sous-unités est essentielle pour l'activité catalytique

de cette enzyme. (Lopez-Farre et al., 2002) Chaque sous-unité a un domaine N-terminal régulateur et un domaine C-terminal catalytique. La GCs possède un groupe hème prosthétique avec un noyau pentacoordonné ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Ce noyau est associé avec un groupe axiale imidazole de l'histidine 105 de la sous-unité  $\beta$ . Le NO se lie sur la sixième position de l'anneau hème et brise le lien entre l'histidine axiale et le fer et forme un lien avec le fer. Ainsi, il y a formation du complexe fer-nitrosyl. (Lucas et al., 2000) Une fois activée, la GCs catalyse la formation du GMPc. La phosphodiesterase est une enzyme qui dégrade le GMPc empêchant ainsi son action. (Mullershausen et al., 2003) Le GMPc régule l'activité de la phosphodiesterase et ceci module la durée et l'amplitude de cette voie de signalisation. (Schlossmann et al., 2003)

Le principal médiateur de la signalisation par le GMPc est la PKG qui catalyse le transfert d'un phosphate à partir de l'ATP sur un résidu sérine ou thréonine de plusieurs protéines régulatrices. Ainsi, cette protéine, une fois phosphorylée, cause la translation du stimulus extracellulaire en une fonction biologique spécifique. D'ailleurs, l'activation de cette voie est majoritairement responsable des effets biologiques du NO. Cette voie peut être bloquée par plusieurs agents pharmacologiques comme le 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) qui inhibe l'activité de la GCs. Au début, il agit comme un inhibiteur compétitif pour le site de liaison du NO. Par la suite, l'ODQ agit par un système d'inhibition non-compétitif durant lequel l'ODQ oxyde l'ion ferreux en ion ferrique de sorte que ce dernier ne peut plus lier le NO. (Schrammel A et al., 1996)

**Figure 2 Structure de la guanylate cyclase soluble.** La GCs est un hétérodimère formé d'un domaine régulateur amino-terminal contenant le groupe prosthétique hème. Ce noyau forme une liaison imidazole axiale avec l'histidine 105 de la sous unité  $\beta$ . La GCs possède aussi un domaine de dimérisation et un domaine catalytique carboxy-terminal.



### 3.2 Voies de signalisation indépendantes du GMP cyclique

Le NO, via des voies GMPc indépendantes, cause des effets pathologiques et ce, directement par sa forme radicale mais surtout indirectement par la formation d'autres molécules réactives comme le ONOO<sup>-</sup>. Le peroxy-nitrite, une molécule cytotoxique, est formé suite à une réaction entre le NO et l'anion superoxide. (Beckman et Koppenol, 1996) Le superoxide provient de plusieurs sources dont la chaîne respiratoire mitochondriale, des NADPH oxydases, des xanthines oxydases, de neutrophiles activés, du métabolisme de l'acide arachidonique ainsi que l'autoxydation de certains métabolites comme les catécholamines et la myoglobine. (Ferdinandy et al., 2003)

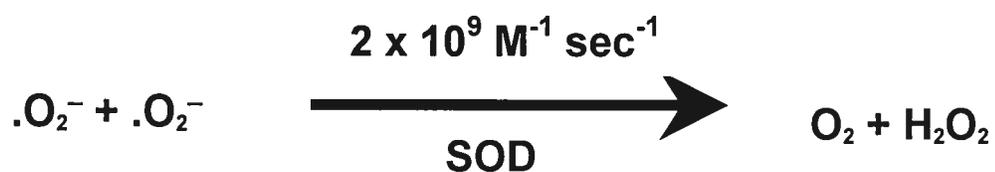
Tout comme le NO, le peroxy-nitrite, encore plus réactif que ce dernier, affecte la fonction de certaines protéines en réagissant avec la cystéine et la tyrosine afin de former respectivement la S-nitrosylation et la C-nitration. (Hanafy et al., 2001) (Ischiropoulos, 2003) Ces deux phénomènes se produisent à des concentrations élevées de NO. De plus, le peroxy-nitrite réagit avec les thiols causant la modification des protéines par oxydation des résidus méthionines, cystéines, tryptophanes et tyrosines. (Viner et al., 1999) (Virag et al., 2003) (Arstall et al., 1999) Le peroxy-nitrite induit aussi la peroxydation des lipides. (Rubbo et al., 1994) Il agit aussi au niveau de l'ADN

en causant sa dégradation (single-strand breakage). Ce phénomène induit un processus secondaire impliquant l'activation de l'enzyme nucléaire poly ADP ribose polymérase (PARP) qui résulte en une détérioration de l'état énergétique en ATP et en  $\text{NAD}^+$ . (Halmosi et al., 2001) Ainsi, les concentrations d'ATP déterminent le mode de mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Il est aussi connu que le  $\text{ONOO}^-$  cause une inhibition irréversible de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Stewart et Heales, 2003) Comme protection contre le peroxy-nitrite, l'organisme est doté d'enzymes, appelées superoxydes dismutases, qui empêchent la formation du peroxy-nitrite.

## 4. Les Superoxydes Dismutases

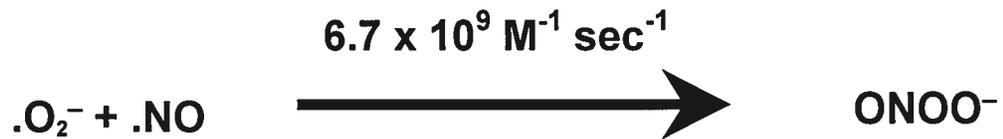
Il existe plusieurs types d'antioxydants endogènes. Parmi lesquels, nous trouvons un système qui contre les effets néfastes du superoxyde et qui est constitué d'enzymes appelées superoxydes dismutases (SOD). Il existe trois types de SOD qui diffèrent selon leur groupe métallique prosthétique. Les CuSOD/ZnSOD sont localisées dans le cytosol tandis que la MnSOD est présente dans la mitochondrie. La MnSOD assure 70 % de l'activité des SOD dans le cœur et 90 % au niveau du myocyte cardiaque. (Assem et al., 1997)

Les SOD catalysent la réaction entre deux superoxydes et produit le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Au niveau de cette dernière réaction, le  $\text{O}_2^-$  est un oxidant et il est réduit en  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui ensuite est dégradé en  $\text{H}_2\text{O}$  et en  $\text{O}_2$  par la catalase. (Jourd'heuil et al., 2001) Par contre, ce système n'est pas très efficace dans

les conditions de production importante de NO. Ce dernier compétitionne avec la SOD pour le superoxide qui résulte dans la formation du ONOO<sup>-</sup>.



Au niveau de l'endothélium vasculaire, en condition physiologique, la concentration de NO est environ 10 nM et celle de la SOD est environ 1 μM. Ainsi, la réaction entre le NO et le O<sub>2</sub><sup>-</sup> ne représente qu'une faible fraction du taux de dismutation du O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la SOD. Ceci résulte dans la formation de très faibles quantités de ONOO<sup>-</sup>. Par contre, en condition pathologique, la concentration de NO devient supérieure à 1 μM résultant ainsi dans la production de grandes quantités de ONOO<sup>-</sup>.

Le superoxide provient de plusieurs sources dont les NOS, la cycloxygénase, la lipoxygénase, ainsi que la chaîne de transport d'électrons mitochondriale mais principalement à partir de la xanthine oxidase et la NADPH oxidase. (Estevez et Jordan, 2002) La Xanthine oxidase, une flavoprotéine contenant du molybdenum et du fer, est une enzyme impliquée dans le métabolisme des purines et des pyrimidines. (Hille et Nishino, 1995)

Son rôle consiste en l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et par la suite, en acide urique. La NADPH oxidase est une enzyme constituée d'un hétérodimère flavocytochrome  $\beta$  composé de deux sous-unités ; p22-phox et p91-phox ou Nox1 dépendamment du type cellulaire. Ces sous-unités sont glycosylées et se lient à deux molécules hèmes et une moitié FAD. Quand la NADPH oxidase est activée, deux protéines cytosoliques sont recrutées, p47-phox et p67-phox ainsi qu'une petite protéine de liaison GTP, rac2. (Griendling et al., 2000) Ainsi, la NADPH oxidase catalyse la formation d'anions superoxydes selon la réaction suivante :



Il existe des composés ferreux porphyriques qui agissent comme des SOD mimétiques. Par exemple, le MnTBAP est un SOD mimétique métalloporphyrique qui possède une activité SOD. (Zingarelli, 1997)

## 5. Les Effets Physiologiques du NO dans le Système Cardiovasculaire

Le NO joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de l'organisme. Il est un médiateur cellulaire qui module de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. Les études suggèrent que le NO peut être cardioprotecteur ou nuisible et ce, dépendamment de plusieurs facteurs. Les effets bénéfiques de cette molécule sont retrouvés au niveau des différents systèmes de l'organisme. Voici quelques points qui démontrent les différents rôles physiologiques du NO au niveau du système cardiovasculaire.

### 5.1 Débit sanguin

Le NO est impliqué dans la régulation du débit sanguin et joue un rôle important dans le contrôle de la tension artérielle par son action vasodilatatrice. Les cellules endothéliales relâchent des petites quantités de NO produisant un niveau basal de relaxation du muscle lisse vasculaire. Un agoniste, comme l'Ach, en se liant sur son récepteur présent sur les cellules endothéliales, cause une augmentation transitoire du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Le calcium se lie à la CaM et ce dernier complexe active la eNOS afin de produire du NO. Le NO diffuse par la suite de la cellule endothéliale vers la

cellule adjacente du muscle lisse où il se lie sur le groupe hème de la GCs. (Lowenstein et al., 1994) Le NO induit une vasodilatation du muscle lisse vasculaire via une augmentation du GMPc intracellulaire. Le GMPc provoque cette action en modulant à la baisse la présence du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans la cellule. (Layland et al., 2002) Le GMPc affecte la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par plusieurs mécanismes et ce, en réduisant l'influx calcique, en augmentant la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  et aussi, en induisant la séquestration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique (RS) par l'activation de l'enzyme calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA). (Sperelakis et al., 1994) (Zhang et al., 2002) (Azatian et al., 1998) SERCA est une pompe active localisée sur le RS qui favorise l'influx des ions calciques à l'intérieur du RS.

## 5.2 Fonction cardiaque

Le NO a des effets chronotropes et ionotropes négatifs. Au niveau du cœur, l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques produit une réponse chronotropique et ionotropique positive. Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont couplés à la protéine G stimulatrice qui induit la production de l'AMPc. L'AMPc active la protéine kinase A qui va augmenter directement le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Les ions de  $\text{Ca}^{2+}$  diffusent dans les myofibrilles et catalysent la réaction chimique qui provoque la liaison des têtes de myosine sur les

filaments d'actine (couplage excitation-contraction). La voie qui s'oppose à cette dernière se fait par des récepteurs muscariniques couplés à une protéine G inhibitrice qui empêche la production de l'AMPc par l'AC et en même temps, active la production de NO par eNOS. Ainsi, le NO diminue la réponse inotrope et chronotrope via des voies GMPc dépendantes et indépendantes. (Champion et al., 2003) Il y a alors inhibition par la voie GMPc de l'influx calcique à partir des canaux calciques L-type voltage dépendant. (Mery et al., 1991) De plus, le GMPc stimule l'AMPc phosphodiesterase de type II qui diminue les niveaux de l'AMPc intracellulaire et ainsi l'activité de la PKA. Par contre, l'effet du peroxy-nitrite sur la contractilité est plutôt controversé. D'une part, plusieurs études ont montré que le peroxy-nitrite est responsable d'une diminution de la fonction cardiaque. Récemment, le groupe Gao a montré que les cytokines pro-inflammatoires diminuent la fonction contractile myocardique suite à une augmentation de la production du ONOO<sup>-</sup>. Le ONOO<sup>-</sup> serait responsable de l'activation des MMPs qui causent un clivage protéolytique de la troponine I au niveau du cœur. (Gao et al., 2003) Par contre, certaines études démontrent une activité inotropique positive du ONOO<sup>-</sup> et ce, en modulant l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et aussi en altérant la fonction de SERCA par modification de la Cystéine 349 de SERCA. (Paolucci et al., 2000) (Chesnais et al., 1999) (Viner et al., 1999)

### 5.3 Croissance cellulaire

Au niveau du coeur, le NO module l'expression génique des myocytes cardiaques et ceci serait important dans le contexte de l'hypertrophie ainsi que l'insuffisance cardiaque. Le NO diminue la réponse hypertrophique des myocytes et des fibroblastes cardiaques via une inhibition de l'influx calcique qui se fait de façon GMPc dépendante. (Calderone et al., 1998) Le NO inhibe la fibrose interstitielle causée par la croissance de fibroblastes cardiaques et ce, en diminuant l'expression du TGF- $\beta$ 3 de façon GMPc dépendante. (Abdelaziz et al., 2001) De plus, récemment, il a été démontré qu'il y a diminution, au niveau des myocytes cardiaques stimulés par l'ET-1, de l'expression de la protéine musculaire LIM (MLP) qui est associée au cytosquelette. Ceci se fait par des voies de signalisation GMPc dépendantes et indépendantes. La MLP est une protéine exprimée de façon importante dans le muscle strié. Dans le myocyte cardiaque, cette protéine, localisée dans les stries Z, a pour fonction d'attacher le sarcomère au sarcolemme en interagissant avec deux protéines cytosquelettiques : la  $\alpha$ -actinine et la  $\beta$ -spectrine. (Heineke et al., 2003) Par conséquent, la MLP favorise la différenciation myogénique et elle est importante dans le maintien de l'intégrité structurale du compartiment contractile. (Flick et Konieczny, 2000) Elle est nécessaire au développement de l'hypertrophie et l'assemblage des sarcomères. Ainsi, dans les conditions pathophysiologiques, l'inhibition GMPc dépendante et indépendante de l'expression de la MLP par le NO empêche en partie la réponse hypertrophique.

## 6. Les Effets Pathologiques du NO dans le Système Cardiovasculaire

### 6.1 Infarctus myocardique

Il est bien connu que la dysfonction endothéliale joue un rôle central dans les maladies cardiovasculaires. La dégradation du NO est un parmi plusieurs facteurs responsable de cette dysfonction endothéliale. Comme déjà expliqué, ce phénomène a lieu suite à une augmentation du stress oxydatif qui favorise une interaction entre le NO et le superoxyde dans le but de former le peroxynitrite. (De Gasparo, 2002) Ce stress oxydatif est ainsi associé à plusieurs conditions comme l'altération dans la vasorelaxation, la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire et la formation de l'athérosclérose résultant en une thrombose. Ceci engendre des changements structuraux qui causent un blocage au niveau des artères coronaires. Par conséquent, la région affectée devient ischémique et provoque un infarctus du myocarde. Une région est dite ischémique lorsqu'elle est dépourvue d'oxygène suite à un débit sanguin inadéquat. Par conséquent, dans cette zone ischémique, une inflammation a lieu et il se produit une perte des cardiomyocytes. Alors, il y a élimination de la performance contractile normale de la région affectée amenant du fait même des contractions asynergiques. De plus, ceci résulte en une augmentation de la surcharge hémodynamique sur la zone entourant la région infarctée ainsi que sur le myocarde non infarcté. Il y a activation des voies de signalisations

biochimiques qui déclenchent des changements réparatifs qui aboutissent principalement et essentiellement à la formation d'une cicatrice fibreuse. (Sutton et Sharpe, 2000) Ce processus sera expliqué en détail ultérieurement. Un grand nombre d'études a investigué le rôle controversé du NO au niveau de l'ischémie myocardique. Des évidences suggèrent que, dans le cœur ischémique, le NO endogène réduit la contractilité myocardique et améliore la dysfonction métabolique. (Node et al., 1996) Des études ont aussi démontré une amélioration de la fonction contractile et par le fait même, une amélioration du taux de survie chez les souris déficientes en iNOS. (Sam et al., 2001) De plus, cette molécule est cardioprotectrice car elle joue un rôle dans le préconditionnement ischémique. (Guo et al., 1999) Par contre, plusieurs données suggèrent que, durant l'ischémie-reperfusion, il y a production excessive de radicaux libres ainsi que formation de peroxy-nitrite issu de l'interaction entre le NO et le superoxyde. Le peroxy-nitrite ainsi produit contribue aux dommages endothéliales et à la dysfonction ventriculaire. (Yasmin et Strynadka, 1997) D'ailleurs, il a été démontré qu'une augmentation dans la disponibilité du NO est efficace afin de réduire la dysfonction ventriculaire dans le cœur reperfusé après un infarctus. (Jugdutt, 2003) Ainsi, le rôle controversé du NO est basé sur le taux de synthèse de cette molécule et évidemment, sur l'expression de l'isoforme inductible de NOS.

## 6.2 Apoptose des Myocytes Cardiaques

Comme déjà mentionné, dans la zone ischémique, il y a perte des myocytes cardiaques et par conséquent, perte de matériel contractile. La mort des myocytes cardiaques peut se faire soit par nécrose ou par apoptose. La prochaine section se concentre sur le phénomène de mort cellulaire par apoptose ainsi que l'effet du NO sur ce processus.

### 6.2.1 Apoptose et Remodelage Cardiaque

L'apoptose est essentielle au développement normal ainsi qu'au renouvellement physiologique cellulaire. Par contre, un excès d'apoptose amène des dommages cellulaires. De plus, dans certains états pathologiques, la cellule n'entre pas en mode apoptotique et cela cause une croissance cellulaire accrue. Au cours du développement embryonnaire, l'apoptose joue un rôle important dans le cœur et contribue à la formation des valves cardiaques, du système de conduction et de la vasculature coronarienne. (Fisher et al., 2000) Alors, au cours de la morphogénèse, ce processus de mort cellulaire permet d'éliminer les cellules anormales ou mal localisées ainsi que d'éliminer les structures vestigiales. Par contre, l'apoptose des myocytes cardiaques est une variable importante dans le développement de plusieurs maladies cardiaques comme la dysfonction ventriculaire, l'hypertension systémique, l'insuffisance cardiaque ainsi que

l'ischémie myocardique. Plusieurs études proposent que l'activation accrue de l'apoptose au niveau des myocytes cardiaques contribue de façon importante à la génération de l'insuffisance cardiaque. (Chen et Tu, 2002) Ainsi, cette mort cellulaire est un facteur important dans le remodelage cardiaque car elle engendre une perte du tissu contractile, l'hypertrophie des myocytes de la région environnante ainsi qu'une fibrose réparative et réactive. Éventuellement, à long terme, ceci amène au développement de l'insuffisance cardiaque.

L'insuffisance cardiaque est un état pathophysiologique où une anomalie de la fonction cardiaque entraîne une défaillance de la pompe qui devient incapable d'assurer un débit sanguin nécessaire à la demande métabolique de l'organisme. Une des caractéristiques du cœur défaillant est la détérioration progressive du ventricule gauche. Plusieurs études supportent l'idée, qu'avant la défaillance cardiaque, il y a perte des cardiomyocytes par apoptose. (Sabbah, 2000) (Narula et al., 1996) Ainsi, ce remodelage cardiaque, qui consiste en plusieurs changements aux niveaux moléculaires et cellulaires, représente un facteur essentiel dans la progression de la pathologie de l'insuffisance cardiaque. Il est connu que le NO joue un rôle important dans le remodelage cardiaque et ce, en affectant plusieurs composantes dont l'hypertrophie et l'apoptose. (Calderone et al., 2000) (Wollert et Drexler, 2002) Comme déjà expliqué, le NO est un facteur

antihypertrophique. Par contre, au niveau du cœur, l'effet apoptotique du NO est controversé.

## 6.2.2 Mécanismes Attribués à l'Apoptose

L'apoptose est un processus actif, très régulé et génétiquement programmé. La cellule qui entre en apoptose subit plusieurs modifications biochimiques et morphologiques dont une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, la perte du potentiel membranaire mitochondriale et la fragmentation de l'ADN. De plus, la membrane plasmatique subit des changements qui promouvoient la phagocytose comme la perte de l'asymétrie des phospholipides ainsi que la translocation des phosphatidylsérines de l'intérieur vers la surface externe de la membrane. (Majno et Joris, 1995) Les changements morphologiques consistent majoritairement en une condensation du noyau et du cytoplasme ainsi qu'une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui seront éventuellement phagocytés. Ainsi, elle se différencie de la nécrose qui est caractérisée par des dommages au niveau membranaire ainsi qu'une augmentation de la perméabilité cellulaire. En général, l'apoptose est le résultat d'une perte de balance entre des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. C'est un phénomène qui peut impliquer ou non des caspases qui sont des protéases ainsi que des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. (Kim et al., 1999)

Il est aussi connu que l'activation des caspases influence d'autres processus que la mort cellulaire. Par exemple, la caspase 1 est aussi connue sous le nom de l'enzyme de conversion de l'IL-1 $\beta$  (ICE) et active d'autres interleukines. Ces dernières substances inflammatoires jouent aussi un rôle important dans la progression de l'insuffisance cardiaque. (Loppnow et al., 2001) (Woldbaek et al., 2003) De plus, la caspase 3 détruit les protéines myofibrillaires particulièrement la myosine à chaîne légère qui affecte ainsi l'activité ATPasique et du fait même la contraction. Ce dernier mécanisme peut expliquer la présence d'une détérioration contractile dans la phase de l'insuffisance cardiaque. (Communal et al., 2002)

### 6.2.3 Rôle du NO dans l'Apoptose

Le rôle exacte du NO dans l'apoptose au niveau du cœur adulte est controversé car le NO possède à la fois des effets pro-apoptotiques et anti-apoptotiques sur le myocarde. (Ferdinandy et al., 2003) Le NO inhibe l'apoptose par plusieurs mécanismes dont l'inhibition de l'activité de certaines caspases (3-6-7-8) par S-nitrosylation. (Li et al., 1997) Ainsi, le NO inhibe la relâche du cytochrome C, un amplificateur de la signalisation apoptotique, à partir de la mitochondrie. Par contre, la formation du ONOO<sup>-</sup> serait la cause majeure des effets apoptotiques du NO. Alors, cet effet paradoxal de la molécule de NO pourrait être expliqué par la quantité de NO générée

(extensive, non régulée), par sa localisation intracellulaire temporo-spatiale ainsi que l'état rédox du milieu. Ces situations, parmi d'autres, modifient le rôle de cette molécule et lui permettent d'agir à la fois comme un promoteur ou un inhibiteur apoptotique.

## 7. Fibrose Réparative versus Fibrose Réactive

Suite à un infarctus du myocarde, les fibroblastes de la région affectée, étant des cellules pluripotentiellles, sécrètent une variété de substances comme les cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) ainsi que des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1, FGF) en réponse à différents stimuli dont l'hypoxie et le stress mécanique. Ainsi, le TGF- $\beta$ 1 stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes afin de former la cicatrice. Les fibroblastes cardiaques représentent le type cellulaire le plus abondant dans le myocardium et il est responsable de la déposition de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire (MEC) est composée de protéines structurales et adhésives comme la collagène et la fibronectine. Les propriétés de ces protéines confèrent une grande rigidité au myocarde et elles créent une hétérogénéité électrique engendrant des arythmies. (Swynghedauw, 1999) Ainsi, suite à un infarctus du myocarde, il y a une augmentation de la production et de la concentration des protéines de collagène et de fibronectine. (Assayag et al.,

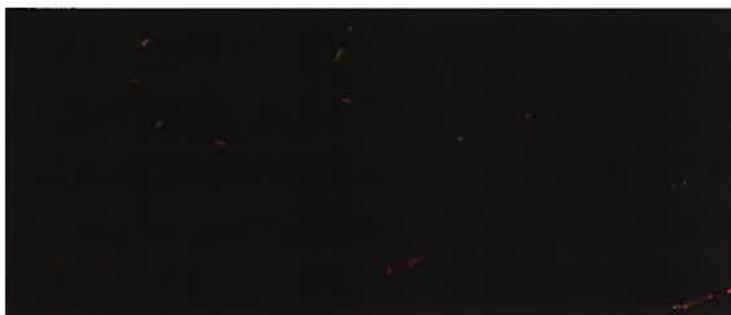
1997) Cette déposition excessive de la MEC est appelée fibrose et affecte le bon fonctionnement cardiaque. (MacKenna et al., 2000)

Il existe deux différents types de fibrose : la fibrose réparative et la fibrose réactive. Le groupe Calderone montre une technique de marquage de la collagène de type 1 à l'aide du Sirius red. (Mercier et al., 2002) (Fig. 3) La fibrose réparative a lieu en réponse à une perte du matériel myocardique. Par contre, une fibrose réactive est une réaction à une inflammation et elle est observée en absence de perte cellulaire. La fibrose réparative résulte en la formation de la cicatrice et elle sera entourée par la fibrose réactive. Parallèlement à ceci, dans la zone non infarctée, nous assistons à une hypertrophie des myocytes cardiaques dans le but d'améliorer la fonction du ventricule en tant que pompe. Ainsi, cette réponse hypertrophique est bénéfique et essentielle car elle augmente le nombre d'unité contractile et diminue le stress sur la paroi ventriculaire à des niveaux normaux selon la loi de la place. Le stress mécanique ainsi que l'étirement des cardiomyocytes sont considérés comme les stimuli déclencheurs de cette croissance du myocarde. De plus, il y a relâche de plusieurs facteurs induisant l'hypertrophie comme l'Ang II, l'ET-1 et le TGF- $\beta$ . Par contre, à long terme, cette hypertrophie qui s'est établie n'arrive plus à maintenir un fonctionnement cardiaque normal. Malheureusement, cette adaptation atteint certaines limites et ceci dégénère en une insuffisance cardiaque (phase décompensée).

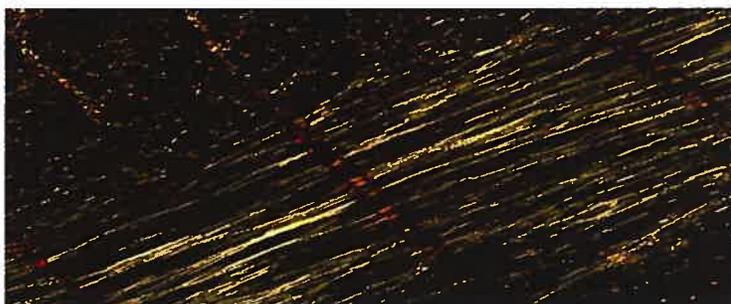
De plus, l'infarctus du myocarde promouvoit la migration de macrophages, de monocytes ainsi que les neutrophiles dans la région infarctée qui résulte en l'initiation d'une réponse inflammatoire. Il a aussi été démontré que cette infiltration des cellules immunitaires dans la région ischémique augmente la lésion tissulaire car elle est responsable d'une production importante de radicaux libres. Des études montrent que l'utilisation d'enzymes antioxydantes comme les SOD mimétiques provoque une diminution de la taille de l'infarctus ainsi qu'une amélioration des dommages myocardiques. (Nakajima et al., 2001) (Hangaishi et al., 2001)

**Figure 3** Fibrose Réactive et Fibrose Réparative suite à un infarctus du myocarde : marquage Sirius Red de la collagène  $\alpha_1$ .

**Normal**



**Fibrose Réactive**



**Fibrose Réparative**



## 8. Hypertrophie Cardiaque

Durant le processus normal de croissance ainsi que durant l'exercice, le remodelage cardiaque est physiologique. Par contre, suite à certaines conditions pathologiques tel l'infarctus du myocarde, la cardiomyopathie, l'hypertension ainsi que les maladies au niveau des valves cardiaques, un remodelage cardiaque pathologique a lieu. En effet, que ce soit une réponse physiologique ou pathologique, cette hypertrophie représente un mécanisme adaptatif qui permet au cœur de s'adapter aux changements de la charge mécanique. A ce niveau, il est important de noter que le cœur a longtemps été considéré comme un organe différencié de façon terminale. Le dogme supporte l'idée que le myocyte cardiaque ne peut pas subir à la phase adulte aucune division cellulaire. De ce fait, une lésion au tissu myocardique engendre une perte du tissu contractile non remplaçable. Ainsi, suite à un infarctus du myocarde, l'induction de l'hypertrophie dans les myocytes de la région non-infarctée serait le seul mécanisme physiologique adaptatif compensatoire ayant lieu afin de maintenir la fonction cardiaque. Contrairement à ceci, récemment, des évidences suggèrent que le myocyte ventriculaire adulte peut entamer une division mitotique et que, dans le myocarde, il y a présence de cellules précurseurs cardiaques adultes (cellules de souches) capables de se différencier en des myocytes cardiaques. (Kajstura et al., 2004) Alors, suite à un infarctus du myocarde,

l'hypertrophie n'est plus le seul mécanisme compensatoire qui rétablit la perte de la fonction ventriculaire myocardique. La capacité du myocyte à se diviser ainsi que la présence de cellules de souches seraient un processus additif qui aide au rétablissement de la fonction myocardique. Dans les sections qui suivent, l'intérêt est porté sur l'hypertrophie cardiaque pathologique.

## 8.1 Mécanismes de Développement de l'Hypertrophie Cardiaque

### 8.1.1 Hypertrophie Cardiaque Concentrique versus Eccentrique

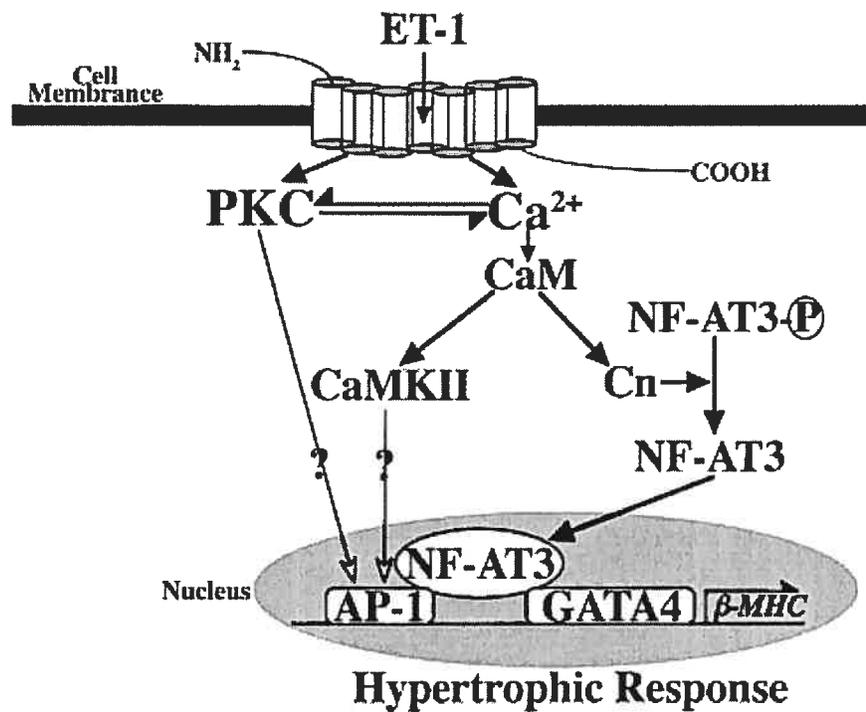
L'hypertrophie du ventricule gauche est associée avec le développement de plusieurs pathologies dont les maladies coronariennes et cérébrovasculaires, l'insuffisance cardiaque ainsi que la mort subite. (Hildick-Smith et Shapiro, 2001) Il existe différentes formes d'hypertrophie cardiaque qui dépendent essentiellement du type de surcharge à laquelle le cœur est exposé. Ainsi, suite à une surcharge volumique, il y a augmentation des sarcomères en série augmentant ainsi la longueur du myocyte et donnant un patron d'hypertrophie ventriculaire eccentric. (Wollert et Drexler, 2002) Par contre, suite à une surcharge pressive, il y a addition de sarcomères en parallèle amenant des myocytes cardiaques plus épais et un patron d'hypertrophie ventriculaire concentrique. (Gerdes et Capasso, 1995)

Alors, il y a une augmentation de la synthèse protéique et des changements de la forme du cardiomyocyte sans modification du nombre de cellules. (Baker et al., 1992)

### **8.1.2 Stimuli Déclencheurs de l'Hypertrophie Cardiaque**

Suite à un stress mécanique, il y a activation de la cascade des protéines kinases. (Komuro, 2001) Par des mécanismes autocrines et paracrines, les cardiomyocytes ainsi que les cellules non cardiomyocytes comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse secrètent aussi des facteurs hypertrophiques afin d'induire l'hypertrophie. L'Ang II est un des facteurs secrétés par ces types cellulaires et qui stimule l'hypertrophie. Ainsi, l'Ang II induit une augmentation de la synthèse protéique. De plus, dans les ventricules hypertrophiés de rats, les études suggèrent une augmentation de l'angiotensinogène et des niveaux d'ARNm de ACE. (Schnkert et al., 1990) De plus, l'ET-1, un peptide vasoconstricteur, est un inducteur potentiel de l'hypertrophie cardiaque. (Yamazaki et al., 1996) (Fig. 4 ; Zhu et al., 2000) L'ET-1 et l'Ang II proviennent de la circulation systémique ainsi que d'une production locale au niveau du cœur par les fibroblastes cardiaques et les myocytes cardiaques.

**Figure 4 Schéma de la cascade de signalisation de l' ET-1 amenant à l'activation du promoteur de la  $\beta$ -MHC et à l'induction de l'hypertrophie.**  
 L'ET-1 augmente le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et active aussi la voie de la PKC. L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  active la CaM, suivi de la calcineurine (Cn) et la CaMK II. Ainsi, il y a activation des facteurs de transcription NF-AT3 et AP-1. La PKC active l'AP-1 et GATA 4.



La NE, en provenance de la circulation systémique et de l'innervation sympathique, stimule aussi l'hypertrophie des myocytes cardiaques néonataux via des récepteurs  $\alpha$ -1 adrénergiques et ce, via une voie de signalisation G  $\alpha$ ,q dépendante. (Simpson, 1983) (Ju et al., 1998) L'activation de la protéine G  $\alpha$ ,q stimule la PLC- $\beta$  qui va ainsi produire le 1,2 diacylglycérol et activer la PKC. L'activation des adrénorecepteurs  $\beta$ 1 dans l'appareil juxtaglomérulaire au niveau du rein induit la relâche de la rénine qui augmente par conséquent la production de l'Ang II. Ceci promouvoit la relâche présynaptique de la NE, bloque sa recapture et potentialise l'action postsynaptique de la NE. (Ball, 1989) Il est intéressant de noter que le TGF-B1 est un facteur qui participe au développement de l'hypertrophie en induisant l'expression de la  $\beta$ -MHC et la  $\alpha$ -actine squelettique au niveau du cardiomyocyte. (Ruwhof et Van der Laarse, 2000) Plusieurs autres facteurs de croissance cardiaque participent à l'induction de l'hypertrophie du ventricule gauche, dépendamment du type de surcharge à laquelle le cœur est exposé, comme le IGF-1 (Serneri et al., 1999), le VEGF (Seko Y et al., 1999) ainsi que la protéine myotrophine (Sen et al., 1990)

### 8.1.3 Phénotypes de l'Hypertrophie Cardiaque

Durant la mise en place de l'hypertrophie cardiaque, plusieurs changements se produisent au niveau du cardiomyocyte. Il y a induction de protooncogènes (c-fos, c-jun et c-myc) qui jouent un rôle transcriptionnel et de gènes des protéines heat shock. (Nishizawa et al., 2002) (Wagner et al., 1999) Il est connu que les HSP jouent un rôle dans la protection myocardique et certaines sont anti-apoptotiques. (Knowlton et Gupta, 2003) Il se produit aussi une réexpression des gènes fœtaux qui codent pour les protéines sarcomériques. Il y a transition de la  $\alpha$ -actine cardiaque à la  $\alpha$ -actine squelettique ainsi qu'une transition de la forme  $\alpha$ -chaîne lourde de la myosine ( $\alpha$ -MHC) à la  $\beta$ -MHC. (Schwartz et al., 1986) Il y a aussi réexpression de l'ANP de l'isoforme de l'oreillette dans le ventricule suite à la surcharge hémodynamique. (Sugden et Clerk, 1998) L'augmentation du taux de synthèse protéique afin d'augmenter le nombre de sarcomères est aussi un changement important qui a lieu au cours du développement de l'hypertrophie. (Zak et al., 1976) De plus, dépendamment de la nature de l'hypertrophie établie, il se passe une régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Plusieurs études s'intéressent à la variation dans l'expression des différentes protéines impliquées dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  comme par exemple SERCA et sa protéine régulatrice phospholamban, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et le récepteur ryanodine. Les résultats obtenus au cours de ces études montrent que, dépendamment de la protéine investiguée, il est possible de voir une

diminution de l'activité enzymatique de cette dernière sans un changement dans son niveau d'expression au niveau de la protéine ; tel est le cas de SERCA. (Munch et al., 1998) Par contre, même si il n'y a pas de changement dans l'expression protéique de SERCA, les niveaux de l'ARNm de cette protéine sont diminués. (Schwinger et al., 1995)

## Objectifs

L'hypertrophie adaptative des myocytes de la région non-infarci est un mécanisme essentiel afin de rétablir la fonction contractile du ventricule gauche. Récemment, il a été démontré que, dans une condition pathologique comme l'infarctus du myocarde, le myocyte cardiaque adulte peut entamer une division cellulaire. De plus, dans le myocarde, il y a présence de cellules adultes cardiaques précurseurs capables de se différencier en des myocytes cardiaques adultes. Ainsi, en plus de l'hypertrophie cardiaque, ces deux derniers processus représentent une composante importante dans le remodelage cardiaque.

Le NO est reconnu pour son action anti-proliférative au niveau de plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules du muscle lisse vasculaire. Dans une condition pathologique tel qu'un infarctus du myocarde, le NO est synthétisé en grande quantité par la forme inducible des synthases du NO. Le but primaire de cette étude est d'investiguer si le NO diminue la synthèse d'ADN du myocyte cardiaque. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés que nous avons stimulés avec SNAP, un donneur du NO. De plus, en utilisant des inhibiteurs des voies de signalisation du NO, nous déterminerons le ou les mécanismes d'action impliqués dans l'action inhibitrice du NO sur la synthèse d'ADN des NNMC.

Par la suite, le but secondaire de cette étude est de voir si la réponse inhibitrice du NO sur la synthèse est maintenue dans les myocytes cardiaques hypertrophiés. Pour vérifier ceci, nous avons prétraités les NNMC avec la norépinéphrine ou l'endothéline avant de faire les stimulations avec SNAP.

## **Matériel et Méthodes**

## **Culture cellulaire de rats nouveau-nés**

Les myocytes cardiaques (NNMC) ont été isolés à partir des rats nouveau-nés par la technique décrite par le groupe de Calderone. (Calderone et al., 1998) Les cœurs ont été enlevés et placés dans du Hanks' Balanced Salt solution (HBSS). Le HBSS est une solution dépourvue de calcium et de magnésium. Par la suite, les ventricules ont été séparés des oreillettes et découpés en petits morceaux. Ensuite, les ventricules sont digérés avec de la trypsine 0.1% diluée dans du HBSS pour 24 h à 4 °C. Le lendemain, l'ajout aux tissus de 10 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enrichi de sérum bovine fœtale (FBS) 7% neutralise l'action de la trypsine. Avec de la collagénase 0.1%, les tissus sont digérés à plusieurs reprises afin de récupérer les cellules cardiaques. Après chaque digestion, les suspensions cellulaires sont récoltées et centrifugées à 12 000 RPM à 4°C. Les culots cellulaires sont ensuite rassemblés dans du HBSS afin d'être lavés à deux reprises et resuspendus dans du FBS. Par la suite, les deux types cellulaires sont séparés selon leur rapidité d'adhésion à la surface du contenant (flacon T75). Les cellules sont incubées durant 45 min dans des flacons T75. Cette dernière étape est répétée une autre fois afin d'assurer la bonne séparation des deux types cellulaires. Les fibroblastes cardiaques ont la propriété de s'attacher en premier à la paroi du tube. Les myocytes, se trouvant dans la suspension, sont récoltés et cultivés dans du FBS pour 24 h selon une

densité cellulaire précise. Ainsi, ils sont placés dans des pétris de 100 mm pour les études des kinases à une densité de 400 cellules par mm<sup>2</sup> et dans des p24, pour les études de croissance à une densité de 300 cellules par mm<sup>2</sup>. Pour les études du TUNEL et d'immunofluorescence, les myocytes cardiaques sont cultivés sur des lamelles à une densité de 300 cellules par mm<sup>2</sup>. Finalement, pour le besoin du protocole expérimental, le milieu est changé pour un milieu riche en ITS (5 µg/ml d'insuline, 5 µg/ml de transférine et 5 ng/ml de sélénite de sodium) et ce, pour 48 h.

Les rats néonataux Sprague-Dawley âgés de 1 à 3 jours proviennent de Charles-River Canada. Le DMEM, le FBS, le HBSS, la trypsine et la collagénase ont été achetés chez GIBCO BRL. L'ITS provient de Collaborative biomedical. Les flacons et les plateaux de p100, p24 et T75 proviennent de Falcon.

### **Mesure de la concentration du GMPc intracellulaire par RIA**

Les myocytes cardiaques sont traités avec 0.5 mM de IBMX (isobutylméthylxanthine) pendant 15 min avant l'addition du donneur du monoxyde d'azote (SNAP) 100 µM pour être ensuite incubés pendant 30 min à 37°C. Après cette incubation de 30 min, la réaction est arrêtée avec 0.1 M de HCL et les pétris furent placés sur glace pendant 30 min. Par la suite, le surnageant est collecté et titré à pH 7.4 avec du sodium acétate 2.5 M (pH

5.8) et du NaOH 5 M. Les niveaux de GMPc sont quantifiés avec le kit standard de RIA de Biomedical Technologies Inc. Le IBMX provient de Sigma. Le HCL, le NaOH, le sodium acétate ont été achetés chez Fisher Scientific.

### **Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine**

Pour les études de croissance, les myocytes néonataux sont traités pour 24 h avec plusieurs concentrations croissantes de SNAP (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100 $\mu$ M). Quatre heures avant la fin du traitement avec SNAP, la [<sup>3</sup>H] thymidine (1  $\mu$ Ci/ml) est ajoutée afin de regarder le profil de la synthèse d'ADN. Une fois le protocole expérimental achevé, les NNMC sont lavés une fois avec du PBS froid (4°C). Ensuite, ces cellules sont gardées, pour une heure, dans de l'acide trichloracétique 5% (TCA) froid afin de précipiter l'ADN. Par la suite, les précipités d'ADN sont lavés avec de l'eau nanopure à 4°C et resuspendus dans NaOH 0.4 M pour 24 h à 4°C. Finalement, cette dernière suspension est transférée dans des fioles à scintillation destinées au compteur de scintillation Beckman. Les résultats obtenus sont en CPM et les graphiques sont présentés en pourcentage de changement versus le basal. Le basal étant l'activité de base au niveau de ces cellules. Pour les études de l'hypertrophie, les NNMC sont prétraités 24 h à l'avance avec la NE 1  $\mu$ M (Arterenol) ou avec l'ET-1 10  $\eta$ M. Par la suite, le protocole précédent est appliqué. De plus, le SOD mimétique (MnTBAP) et

l'inhibiteur de la GCs (ODQ) sont deux drogues utilisées comme prétraitement de 15 min à 30 min avant les traitements subséquents avec SNAP.

La [<sup>3</sup>H]-thymidine provient de chez ICN Biomedical Inc. L'Arterenol et le TCA ont été achetés chez Sigma. L'ET-1, SNAP, ODQ et le MntBAP ont été procurés chez Calbiochem.

### **Mesure de la synthèse protéique par incorporation de la [<sup>3</sup>H]-leucine**

Pour les études de croissance, les myocytes néonataux sont traités pour 24 h avec NE 1  $\mu$ M ou ET-1 10 nM. La [<sup>3</sup>H]-leucine (1  $\mu$ Ci/ml) est ajoutée afin de regarder le profil de la synthèse de protéine. La suite du protocole se fait tel que décrit dans la section de la mesure de la synthèse d'ADN à la page 52. La [<sup>3</sup>H]-leucine provient de chez ICN Biomedical Inc. L'Arterenol et l'ET-1 proviennent de chez Calbiochem.

### **TUNEL**

La technique de TUNEL est utilisée telle que décrite dans le protocole fourni par le manufacturier Boehringer Mannheim. Avant le début du protocole, les cellules sont lavées avec du PBS filtré. Par la suite, elles sont fixées durant 10 min dans une solution de paraformaldéhyde 4% suivi par

une incubation pendant 10 min dans une solution de 50 mM d'ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Après lavage avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution de saponine (0.075 % de saponin/ $1\mu\text{M}$  de EGTA) pour 15 min à T ambiante et lavées ensuite avec du PBS. Suite à cette étape, les cellules sont traitées avec la Rnase (5 mg/ml). La réaction est arrêtée à l'aide d'une solution de 500 mg de lait dans 20 ml d'une solution de SSC 4X (0.15 M de sodium chloride par 0.1 M de sodium citrate). Le noyau est ensuite marqué avec  $4\mu\text{l}$  d'extravidin-FITC par  $200\mu\text{l}$  de staining solution (une dilution de 500 mg de lait, 0.1% de triton x-100 dans 10 ml de SSC 4X) pour 30 min à T pièce. De plus, le noyau a été marqué avec  $0.01\mu\text{M}$  de propidium iodide à T pièce pour 15 min. Les cellules sont conservées dans un milieu DABCO  $0.2\mu\text{M}$  et regardé par microscopie confocale (Zeiss Axiovert).

La paraformaldéhyde, l'EGTA et le sodium citrate ont été achetés chez Fisher Scientific. La Rnase, l'extravidine-FITC, le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , le propidium iodide, le triton X-100, le DABCO et la saponine proviennent de Sigma.

### **Analyse par Immunobuvardage des résidus phosphorylés de ERK et de P38 ainsi que de l'expression de la MnSOD et de iNOS**

Les myocytes cardiaques sont lavés deux fois avec du PBS (pH 7.4 à  $4^\circ\text{C}$ ), puis lysés avec un tampon de lyse contenant du TRIS 10 mmole/L pH7.5, NaCl 150 mmole/L, EDTA 1 mmole/L, EGTA 1 mmole/L, NaF 50 mmole/L, B-glycérophosphate 20 mmole/L, phénylméthylsulfonyl fluoride

(PMSF) 0.5 mmole/L, sodium vanadate 1 mmole/L, triton X-100 1%, nonidet P-40 0.5 %, 1µg/ml de leupeptine et 1 µg/ml d'apotonine. Une fois les échantillons récoltés, ils sont centrifugés à 12 000 RPM afin de récupérer le surnageant. La concentration des protéines est mesurée par la technique de Bradford. Pour les tissus, le même tampon de lyse est préparé et ils sont homogénéisés au polytron à 20 500 RPM afin de récolter les protéines. Par la suite, 50 µg à 100 µg des protéines pour les petits gels d'électrophorèse et 150 µg à 200 µg de protéines pour les gros gels d'électrophorèse sont précipités dans le volume double d'acétone pour un minimum de 30 min. Ce mélange est ensuite centrifugé et le culot dissout dans 10 µL de sample buffer (SBJ) pour les petits gels ou 40 µL de SBJ 1X pour les gros gels d'électrophorèse. Le SBJ est constitué de 1M de tris à pH 6.8, du glycérol 30 %, SDS 6 %, 15 % de β-mercaptoéthanol et du bromophénol bleu. Les échantillons de protéines sont chauffés à 100 °C pendant 5 min et séparés par gel d'électrophorèse SDS-10% polyacrylamide. Ensuite, ces protéines sont transférées sur une membrane PVDF. La membrane est incubée dans une solution de blocage constituée de PBS-Tween1X/lait 5% pendant 1 heure. Ensuite, la membrane est incubée pour 1 heure à la température de la pièce soit avec un anticorps primaire contre les résidus phosphotyrosines de ERK ou de p38 soit contre MnSOD ou iNOS (Dilution 1:500). La membrane est ensuite lavée pendant une heure avec du PBS-T 1X et incubée avec un deuxième anticorps conjugué à la peroxidase Horseradish (1:20 000) pendant 1 heure à la température de la pièce. Finalement, la membrane est lavée

pour 1 heure et les bandes sont détectées par autoradiographie en utilisant le kit de détection ECL.

Les solutions d'acrylamide, La leupeptine, et l'apotonine, le tween, le PMSF ainsi que le reste des substances du tampon de lyse proviennent de chez Sigma. Le glycérol, le  $\beta$ -mercaptoéthanol ont été achetés chez Fisher. La membrane de PVDF provient de NEN Life Science products. Les anticorps de ERK et P38 ont été achetés chez Cell Signaling tandis que les anticorps secondaires ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology. L'anticorps contre la MnSOD provient de Calbiochem. Le kit de détection ECL vient de PerkinElmer Life Sciences.

### **Immunocytochimie**

Les cellules sont fixées tel que décrit au début du protocole du TUNEL à la page 53. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les cellules sont incubées dans une solution de BSA 2% pour 30 min pour être par la suite, incubées avec la Phalloïdine texas red (1:500) qui est un marqueur de l'actine sarcomérique.

## **Ligation de l'artère coronaire (Infarctus du myocarde)**

L'infarctus du myocarde est engendrée suite à la ligation de l'artère coronaire comme décrit par le protocole du groupe Nyguen. (Nyguen et al., 2003)

## **Méthodes statistiques**

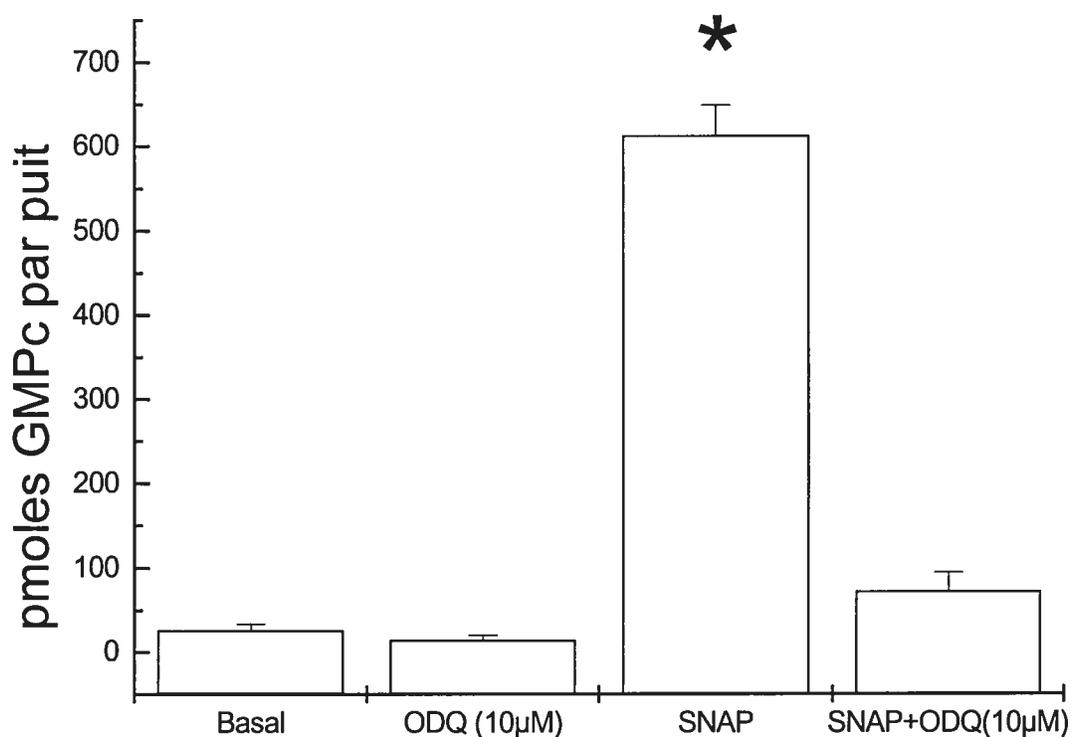
Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et d'erreurs types. La différence entre les moyennes est évaluée par un test-T bilatéral pairé de Student. Les différences entre les moyennes dont le degré de probabilité d'erreur de type  $\alpha$  est inférieur à 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) sont considérées comme étant statistiquement significatives.

# Résultats

### **1. Effet de SNAP sur la production du GMPc intracellulaire, la synthèse d'ADN et les voies de signalisation tyrosines kinases au niveau des myocytes cardiaques de nouveaux-nés.**

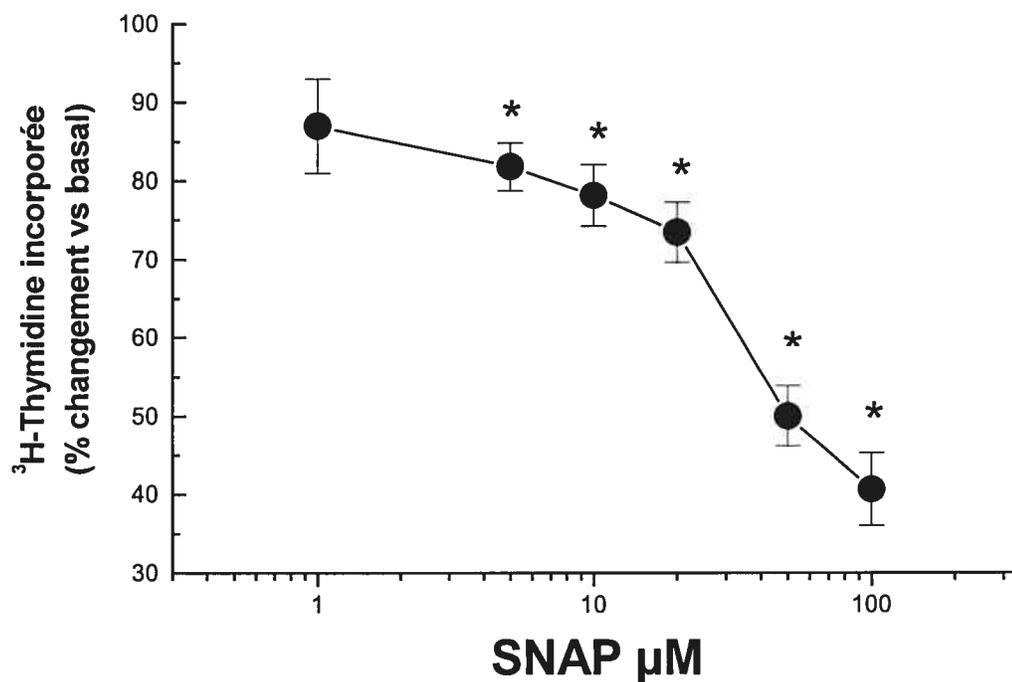
La production basale du GMPc intracellulaire de 28 picomoles par 30 min. SNAP 100  $\mu$ M induit une augmentation de 1138 picomoles de la production du GMPc intracellulaire par 30 min. (Fig. 1) L'application de 10  $\mu$ M d'ODQ, inhibiteur de la GCs, 30 min avant le traitement avec SNAP provoque une inhibition de la production de GMPc intracellulaire. Ces résultats confirment que la voie GMPc dépendante est activée par SNAP.

L'exposition des NNMC à SNAP pour une durée de 24 h cause une diminution dose dépendante de l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine avec un effet maximal de 60 % observé à SNAP 100  $\mu$ M. (Fig. 2) Par conséquent, ceci est traduit par une réduction de la synthèse d'ADN. Parallèlement à ceci, pour vérifier si cette diminution SNAP dépendante de la synthèse d'ADN des NNMC est reliée à une apoptose globale au niveau de ces cellules, la technique de TUNEL fut utilisée. Suite à un traitement de 24 h avec SNAP 100  $\mu$ M, un faible nombre de cellules est marqué par le TUNEL suggérant une légère apoptose versus les cellules non traitées. (Fig. 3) De plus, SNAP provoque une phosphorylation des voies tyrosines kinases comme ERK 1/2 (5 min =  $283 \pm 29\%$  ; 10 min =  $273 \pm 58\%$ ; versus NNMC non traités) et de P38 (5 min =  $697 \pm 35\%$  ; 10 min =  $349 \pm 81\%$ ; NNMC non traités). (Fig. 4)



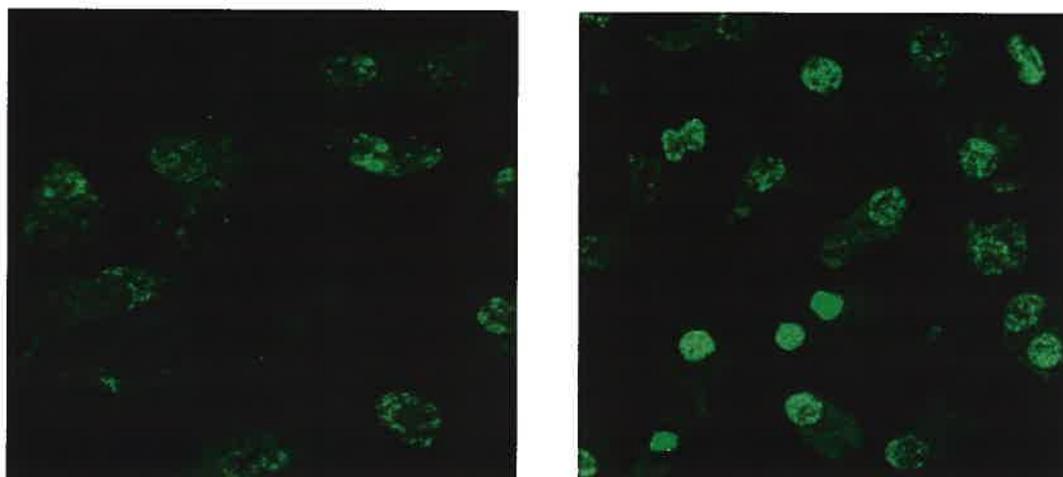
**Figure 1 Mesure de la production du GMPc intracellulaire au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés par RIA.**

Les NNMC sont traités avec SNAP 100 µM pour 30 min en absence ou en présence d'ODQ 10 µM tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. La concentration du GMPc intracellulaire est mesurée par la technique de radioimmunoessai tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=3 ; \*p≤0.05 versus non traités)



**Figure 2** Effet de SNAP sur l'incorporation de la [ $^3\text{H}$ ]-thymidine au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.

Les NNMC sont traités avec SNAP pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Par la suite, 4 h avant la fin du protocole, les NNMC sont incubés avec [ $^3\text{H}$ ]-thymidine 1 $\mu\text{Ci/ml}$ . L'incorporation de la [ $^3\text{H}$ ]-thymidine est déterminée tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=7 ; \*p $\leq$ 0.05 versus NNMC non-traités)



Basal

SNAP 100  $\mu\text{M}$  ; 24h

**Figure 3 Effet de SNAP sur la fragmentation de l'ADN des myocytes cardiaques nouveau-nés visualisé par la technique de TUNEL.**

Les NNMC sont traités avec SNAP 100  $\mu\text{M}$  pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Le TUNEL est marqué avec un anticorps extravidine-FITC tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=4)

Figure 4A

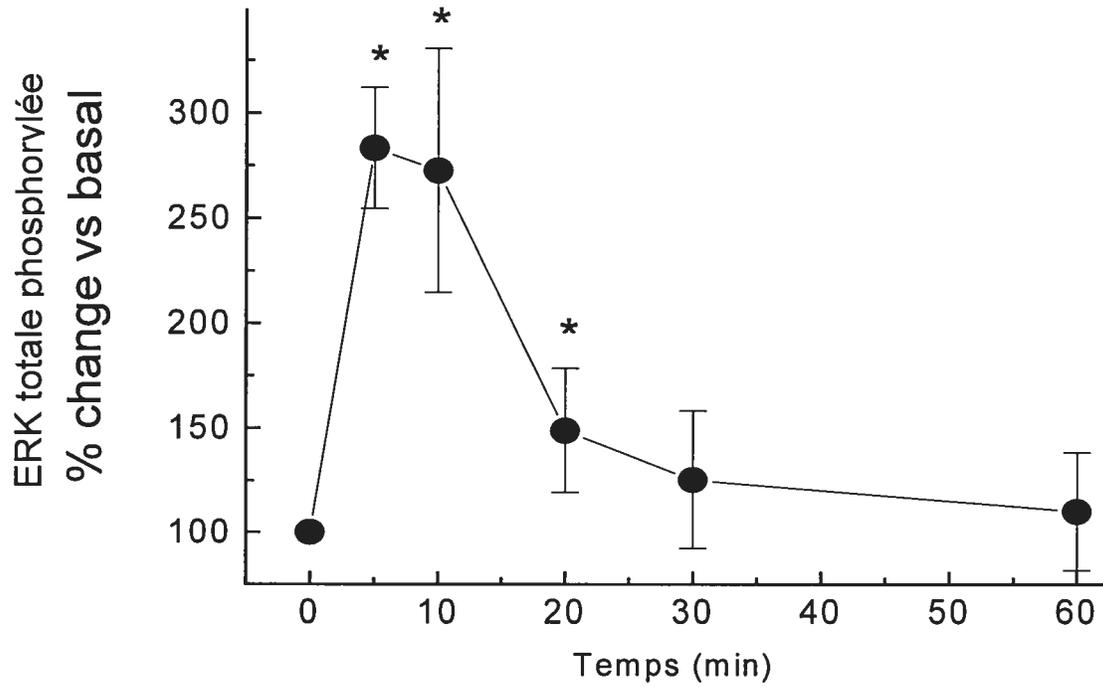


Figure 4B

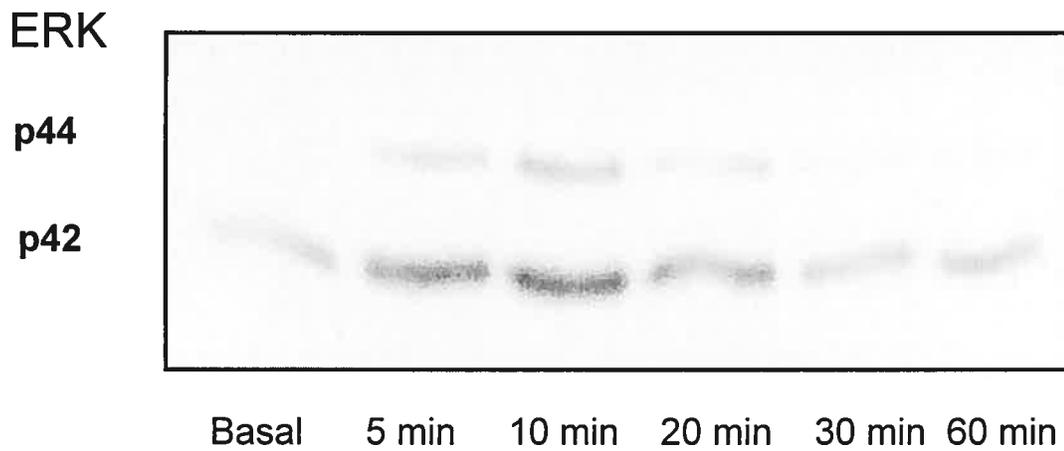


Figure 4C

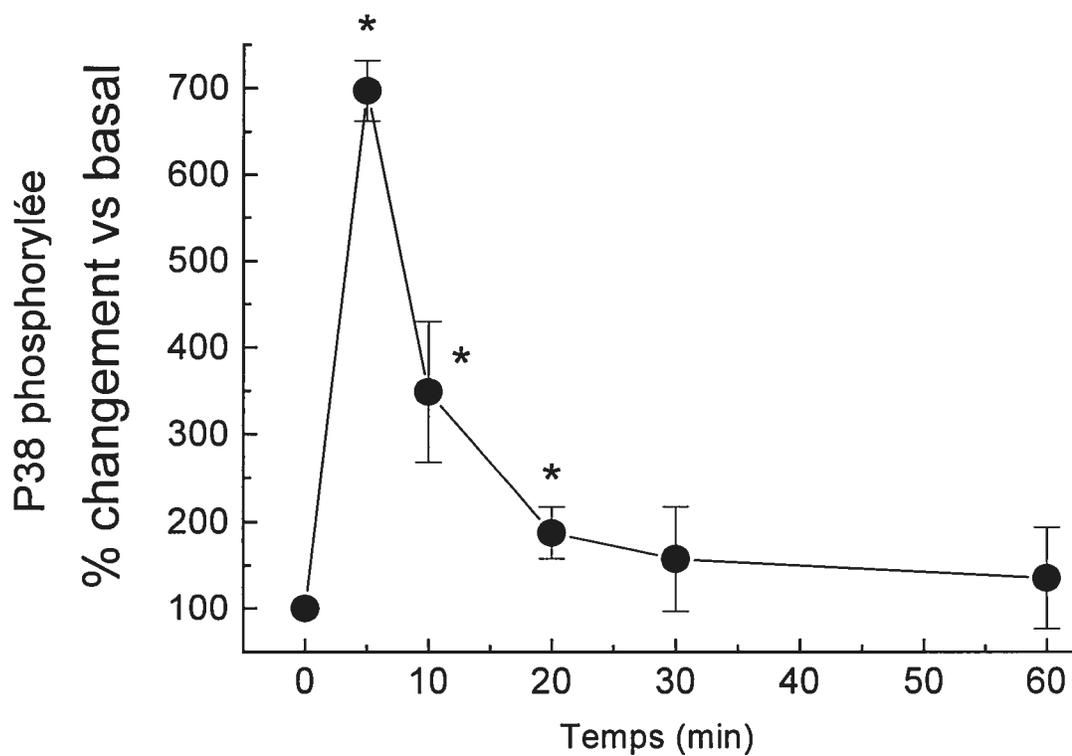
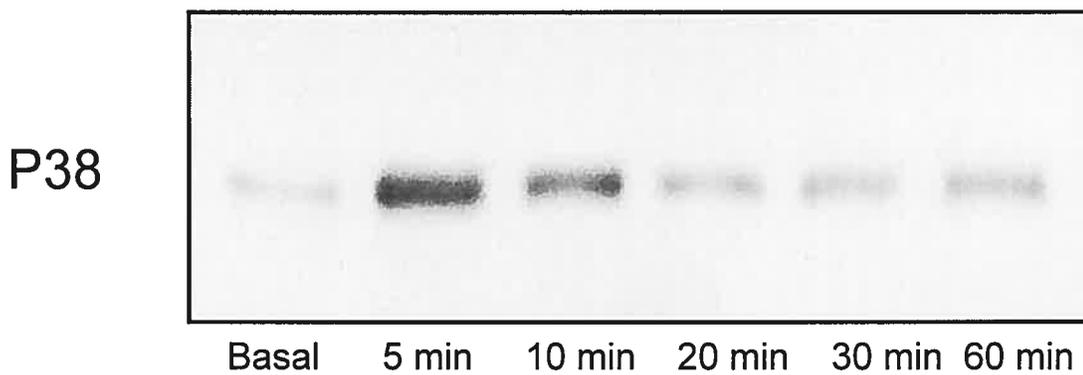


Figure 4D



**Figure 4 Effet de SNAP sur la phosphorylation de ERK et de P38 dans les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.**

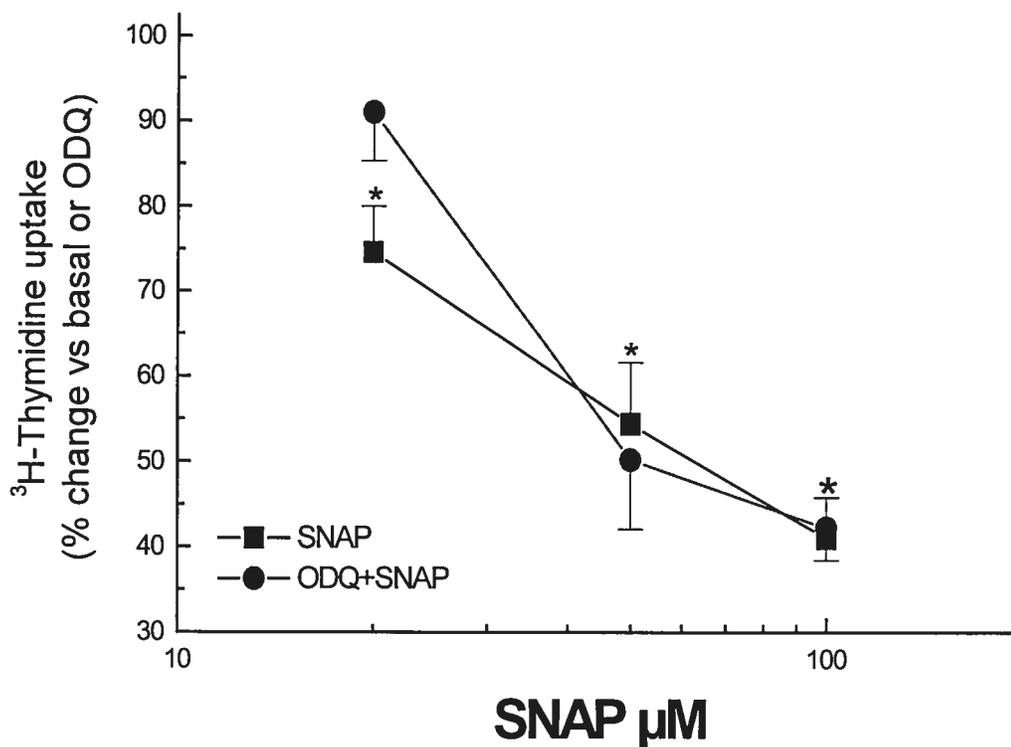
Les NNMC sont exposés à SNAP 100  $\mu$ M à différents temps. La phosphorylation de ERK1/2 et de P38 est évaluée par immunobuvardage tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Fig 4A, représentation graphique de ERK totale phosphorylée. Fig 4B, western blot de ERK 1 (p44) et ERK 2 (p42). Fig 4C, représentation graphique de P38 phosphorylée. Fig 4D, western blot de P38. (n=4; \*p $\leq$ 0.05 versus NNMC non traités)

## **2. Effet du SOD mimétique MnTBAP sur la diminution dose dépendante de la synthèse d'ADN et sur la phosphorylation de ERK et P38 causées par SNAP dans les NNMC.**

Comme déjà démontré, SNAP active effectivement la voie GMPc dépendante. Le prétraitement des NNMC avec l'ODQ 10  $\mu$ M n'inhibe pas la diminution de la synthèse d'ADN causée par SNAP. Ceci suggère que la voie GMPc dépendante n'est pas impliquée dans la diminution de la synthèse d'ADN par SNAP. (Fig. 5) Ainsi, les voies GMPc indépendantes ont été bloquées par l'usage d'un SOD mimétique, le MnTBAP, afin d'empêcher la production du peroxyxynitrite. L'usage du MnTBAP 250  $\mu$ M en prétraitement empêche l'effet inhibiteur de SNAP 50  $\mu$ M (inhibition de 80 %) et SNAP 100  $\mu$ M (inhibition de 70 %) sur la synthèse d'ADN des NNMC. (Fig 6A et Fig 6B)

De plus, l'implication de ERK et P38 a été évaluée dans la diminution de la synthèse d'ADN des NNMC par SNAP. L'action du MnTBAP 250  $\mu$ M sur l'activation de ERK et P38 a été regardée. Ainsi, malgré l'effet inhibiteur du MnTBAP 250  $\mu$ M sur la diminution de la synthèse d'ADN par SNAP, ce SOD mimétique n'empêche pas la phosphorylation de ERK et P38 causée par SNAP. (Fig. 7) Ce qui implique que ces voies de signalisation ne jouent pas un rôle dans la diminution de la synthèse d'ADN par SNAP. Par contre, il est intéressant de noter que le MnTBAP 250  $\mu$ M empêche l'activation de ERK

dans des conditions non stimulées suggérant que le superoxide joue un rôle essentiel dans l'activation de ERK.



**Figure 5 Effet d'ODQ sur la diminution de la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés causée par les doses élevées de SNAP.**

Les NNMC sont prétraités avec ODQ 10  $\mu\text{M}$  pour 30 min avant d'être exposés à SNAP pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Par la suite, 4 h avant la fin du protocole, les NNMC sont incubés avec [ $^3\text{H}$ ]-thymidine 1 $\mu\text{Ci/ml}$ . L'incorporation de la [ $^3\text{H}$ ]-thymidine est déterminée tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=4; \*p<0.05 versus NNMC non traités avec SNAP)

Figure 6A

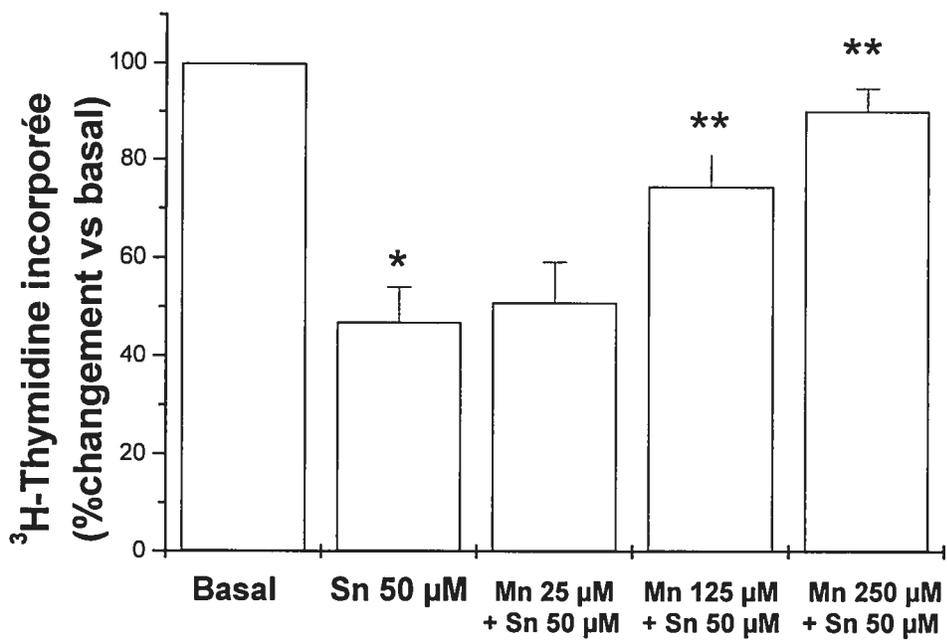
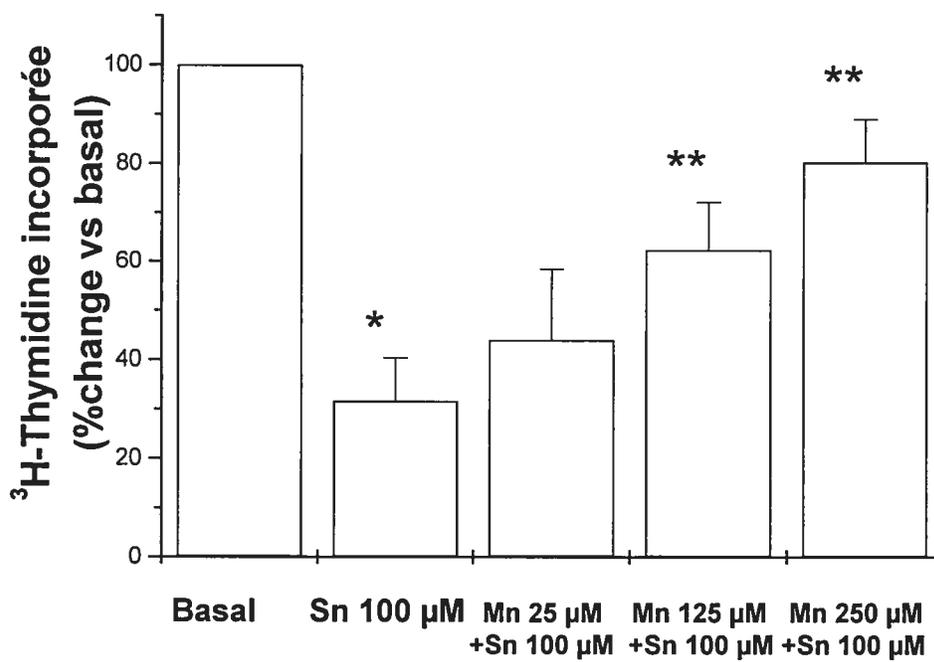


Figure 6B



**Figure 6 Effet du MnTBAP sur la diminution de la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés causée par les doses élevées de SNAP.**

Les NNMC sont prétraités avec différentes concentrations de MnTBAP pour 30 min avant d'être exposés à SNAP (Sn) pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Par la suite, 4 h avant la fin du protocole, les NNMC sont incubés avec [<sup>3</sup>H]-thymidine 1μCi/ml. L'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine est déterminée tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=3 ; \*p≤0.05 versus NNMC non traités et \*\*p≤0.05 versus NNMC traités avec SNAP)

Figure 7

ERK

p44

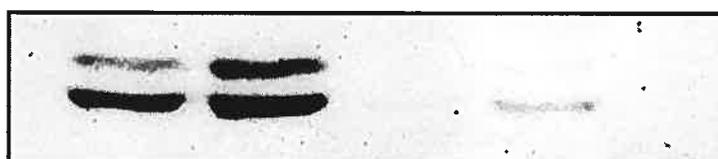
p42



A

p44

p42



B

Basal	SNAP 100 $\mu$ M 5 min	MnTBAP 250 $\mu$ M	MnTBAP + SNAP
-------	------------------------------	-----------------------	------------------

P38



C

Basal	SNAP 100 $\mu$ M 5 min	MnTBAP 250 $\mu$ M	MnTBAP + SNAP
-------	------------------------------	-----------------------	------------------

**Figure 7 Effet du MnTBAP sur la phosphorylation de ERK et de P38 causée par SNAP au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.**

Les NNMC sont prétraités avec MnTBAP 250  $\mu$ M avant d'être exposés à SNAP 100  $\mu$ M pour 5 min. La phosphorylation de ERK1/2 et de P38 est évaluée par immunobuvardage tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Fig A, western blot à faible exposition de ERK 1/2. Fig B, western blot à haute exposition de ERK 1/2. Fig C, western blot de P38. (n=3)

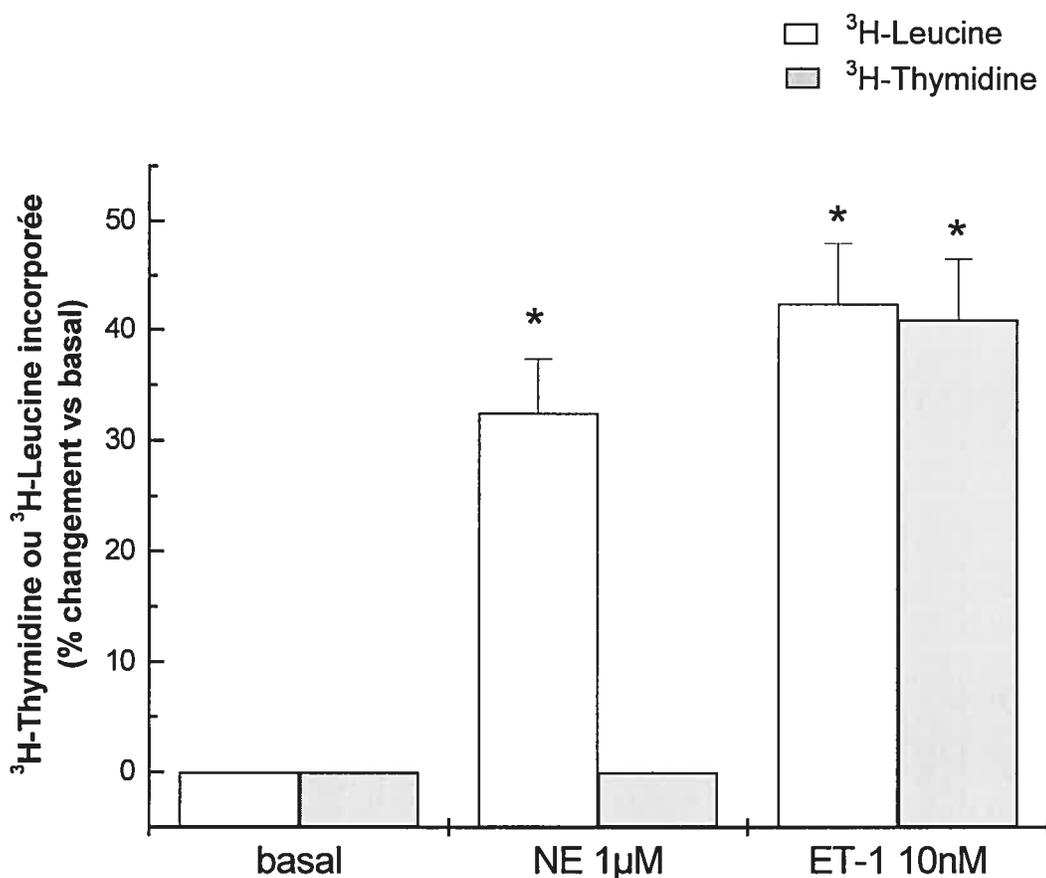
### **3. Effet du prétraitement des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés avec NE ou ET-1 sur l'inhibition SNAP dépendante de la synthèse d'ADN.**

Le groupe de Calderone a montré que, dans les NNMC, la NE 1  $\mu\text{M}$  et l'ET-1 10  $\eta\text{M}$  stimulent l'hypertrophie associée avec une augmentation de la synthèse protéique et une augmentation de l'ANP. (Calderone et al., 2000) Ceci a été confirmé par cette étude qui montre aussi une augmentation de la taille des cellules, une augmentation de la synthèse protéique et une réorganisation des filaments de l'actine  $\alpha$ -sarcomérique suite à une exposition des NNMC à NE 1  $\mu\text{M}$  pour 24 h. (Fig. 8 et Fig. 9)

L'induction de l'hypertrophie par NE ou ET-1 diminue la réponse inhibitrice de SNAP sur la synthèse d'ADN des NNMC. (Fig. 10A et Fig. 10B) Les prétraitements avec la NE 1  $\mu\text{M}$  inhibe la diminution de la synthèse d'ADN causée par SNAP 20  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  avec une inhibition maximale de 43 %. Parallèlement à ceci, les prétraitements avec ET-1 10  $\eta\text{M}$  inhibe la diminution de la synthèse d'ADN causée par SNAP 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  et 50  $\mu\text{M}$  avec une inhibition maximale de 63%. Ces dernières valeurs sont considérées comme étant statistiquement différentes. Par contre, l'inhibition par NE ou ET-1 de la diminution de la synthèse d'ADN engendrée par SNAP 100  $\mu\text{M}$  n'est pas statistiquement différente.

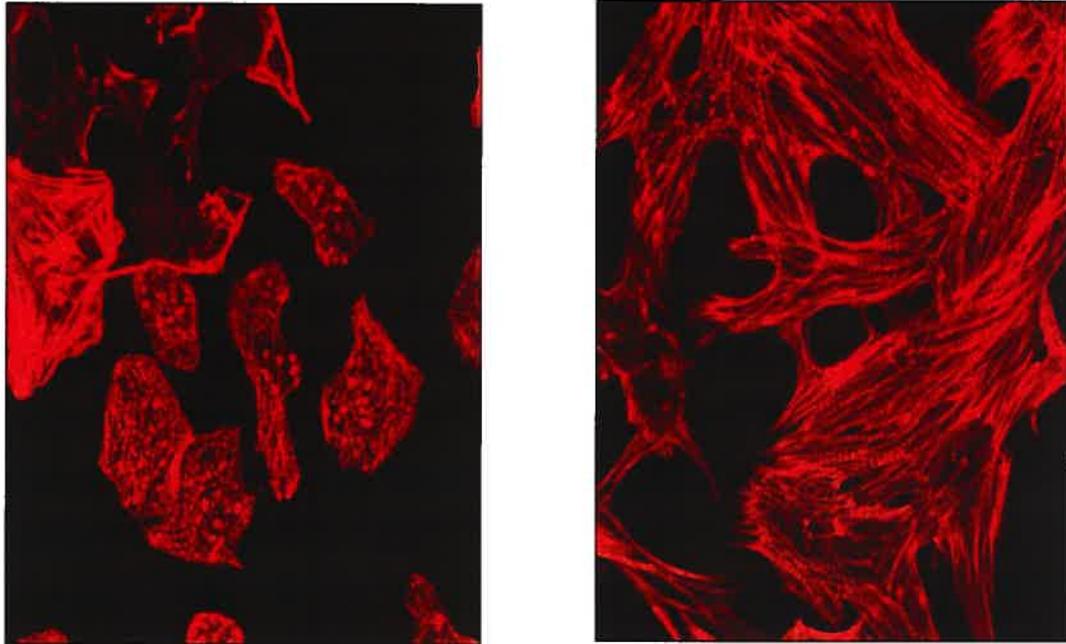
En parallèle, cette hypertrophie bloque aussi la présence de l'apoptose et inhibe la phosphorylation de ERK et P38 observées avec SNAP 100  $\mu\text{M}$ .

(Fig. 11 et Fig. 12) Vu que le MnTBAP bloque la diminution dose dépendante de la synthèse d'ADN par SNAP, l'évaluation de l'expression des SOD semblait importante. Ainsi, les résultats préliminaires démontrent que l'effet protecteur de l'hypertrophie sur la synthèse d'ADN des NNMC ne se fait pas via les superoxides dismutases car il n'y a pas augmentation de l'expression protéique de la MnSOD suite à la stimulation par la NE 1  $\mu$ M.



**Figure 8** Effet de NE et ET-1 sur l'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]-Thymidine ou [ $^3\text{H}$ ]-Leucine au niveau des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.

Les NNMC sont traités avec NE 1  $\mu\text{M}$  ou ET-1 10 nM pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Les NNMC sont incubés en présence de [ $^3\text{H}$ ]-Thymidine ou de [ $^3\text{H}$ ]-Leucine tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. L'incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine ou de la  $^3\text{H}$ -Leucine est déterminée tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=4 ; \* $p < 0.05$  versus NNMC non traités)



Basal

NE; 1  $\mu$ M, 24 h

**Figure 9** Effet de la NE sur les filaments d'actine sarcomérique au niveau des myocytes cardiaques de nouveau-nés visualisé par marquage Texas-Red.

Les NNMC sont traités avec NE 1  $\mu$ M pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. L'actine sarcomérique est marquée à l'aide de la phalloïdine Texas-red tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*.

Figure 10A

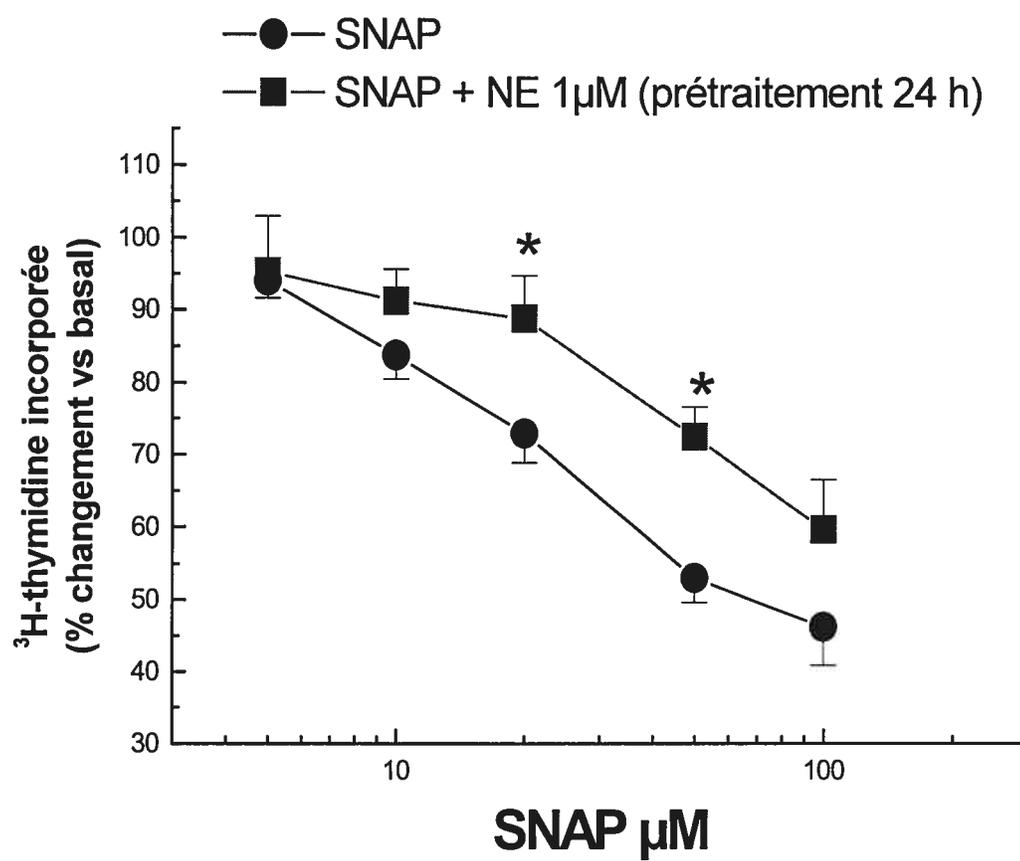
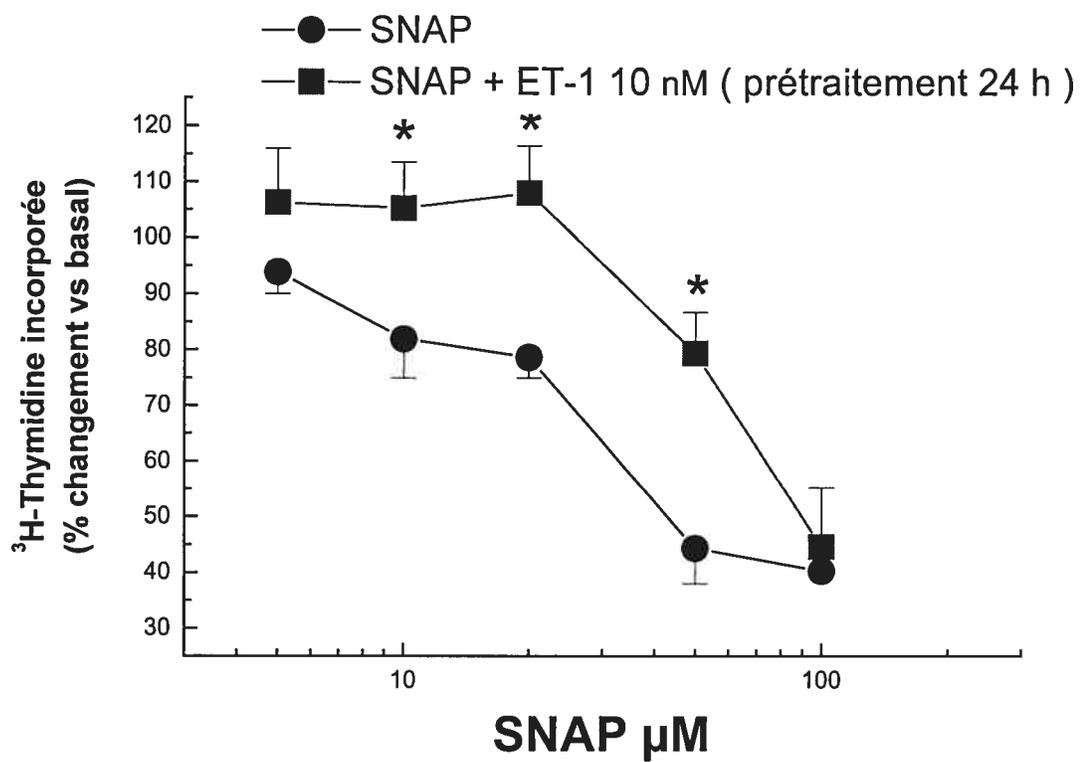
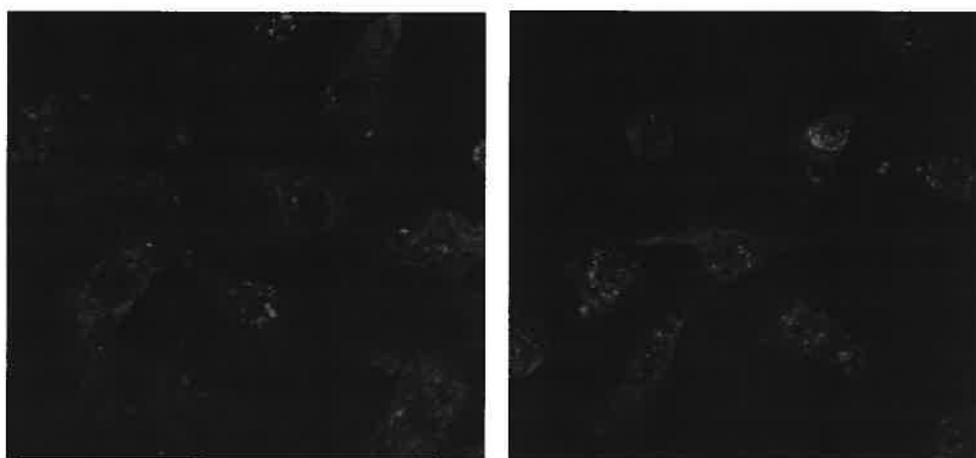


Figure 10B



**Figure 10 Effet de la NE ou l'ET-1 sur la réponse inhibitrice de SNAP sur la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.**

Les NNMC sont prétraités avec NE 1  $\mu$ M (n=8) ou ET-1 10 nM (n=5) pour 24 h avant les traitements avec SNAP tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Par la suite, 4 h avant la fin du protocole, les NNMC sont incubés avec [ $^3$ H]-thymidine 1  $\mu$ Ci/ml. L'incorporation de la [ $^3$ H]-thymidine est déterminée tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (\* $p \leq 0.05$  versus courbe sans prétraitement avec NE ou ET-1)



NE 1 $\mu$ M

NE + SNAP 100 $\mu$ M

**Figure 11** Effet de la NE sur la fragmentation de l'ADN des myocytes cardiaques de nouveau-nés observé avec SNAP 100  $\mu$ M visualisé par la technique de TUNEL.

Les NNMC sont prétraités avec NE 1 $\mu$ M pour 24 h avant d'être exposés à SNAP 100  $\mu$ M pour 24 h tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Le TUNEL est marqué avec un anticorps extravidine-FITC tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. (n=4 )

Figure 12A

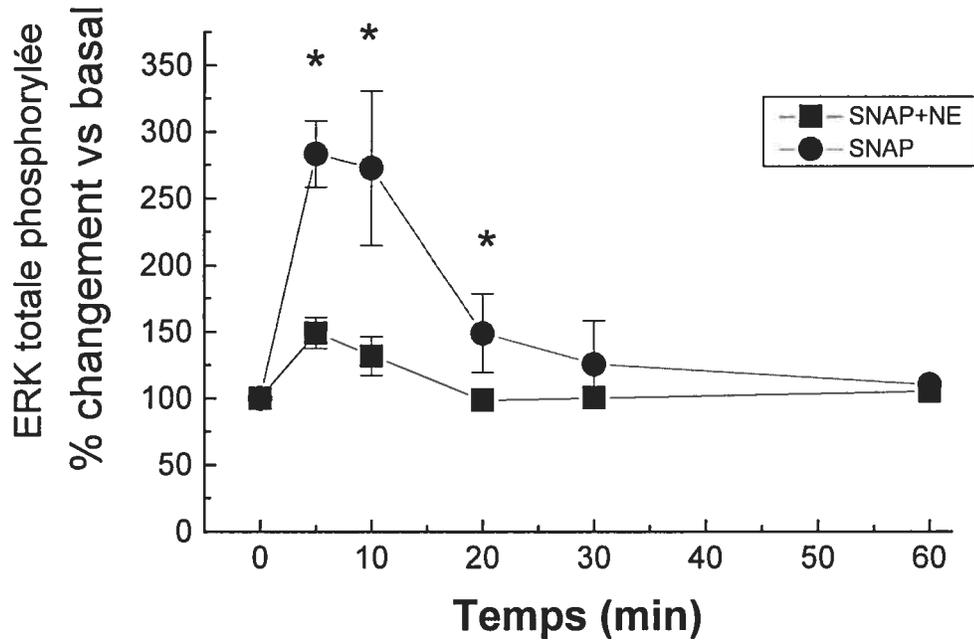


Figure 12B

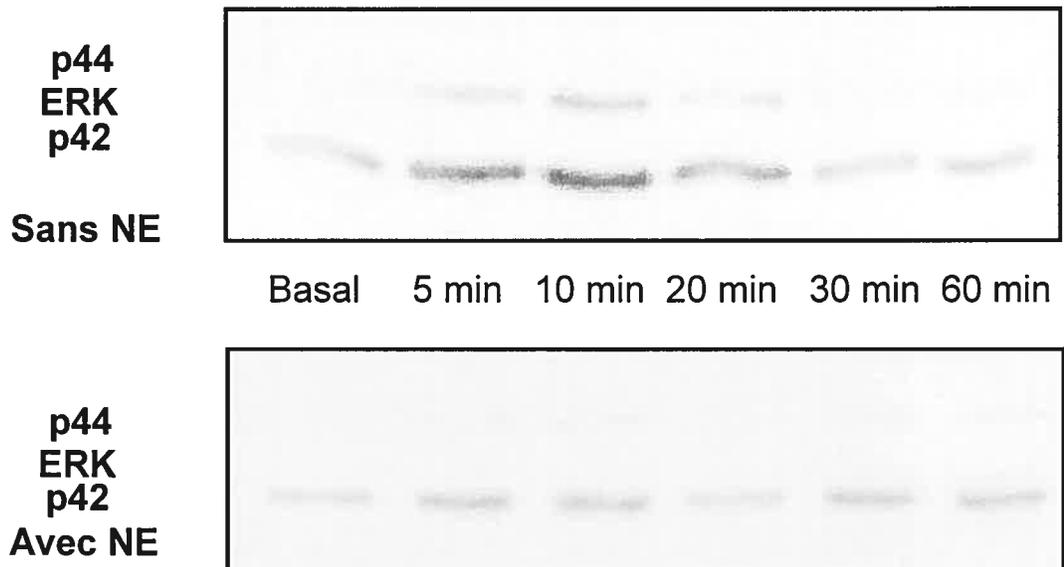


Figure 12C

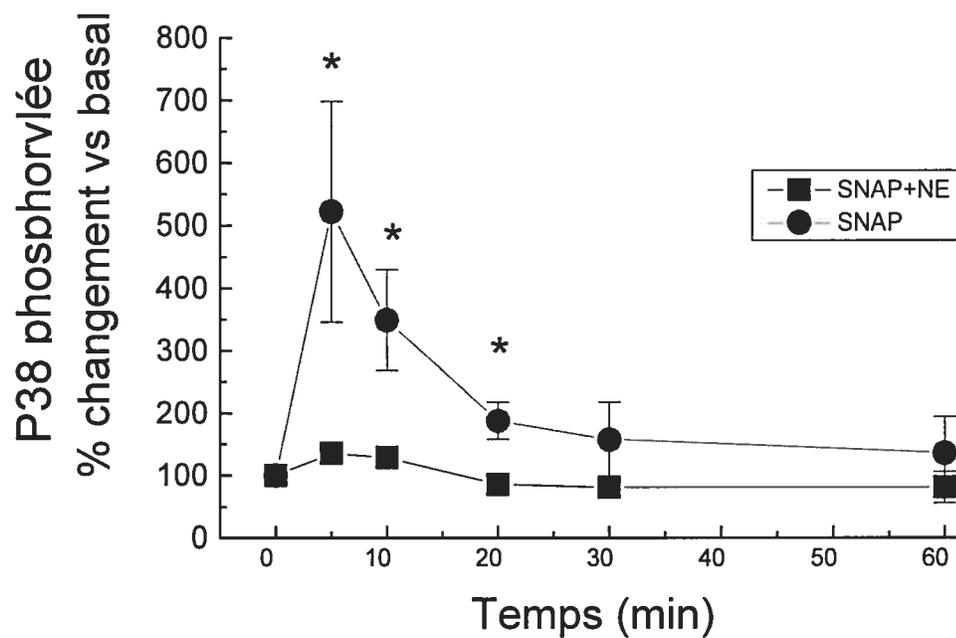
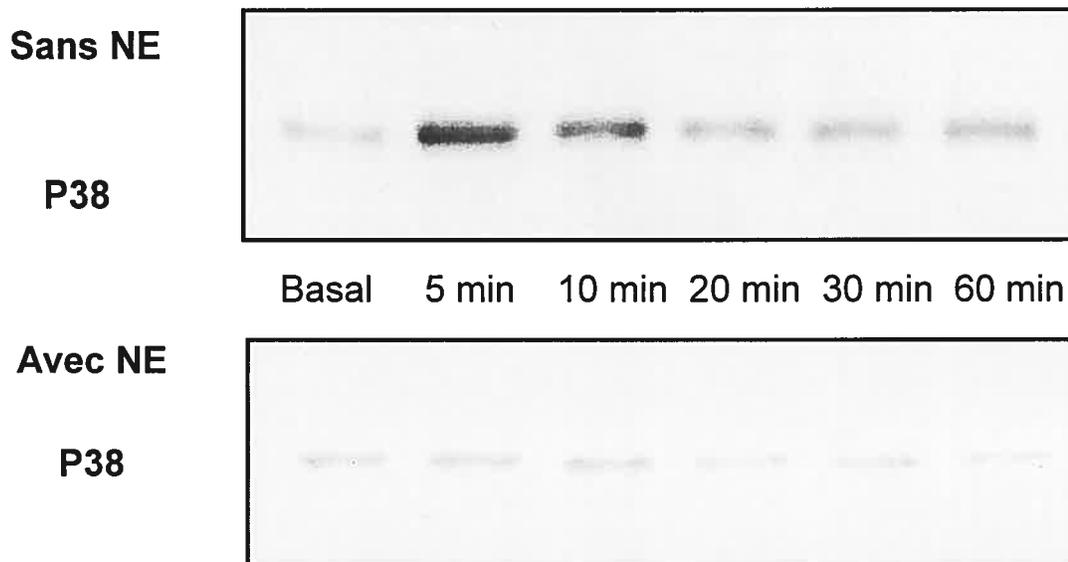


Figure 12D

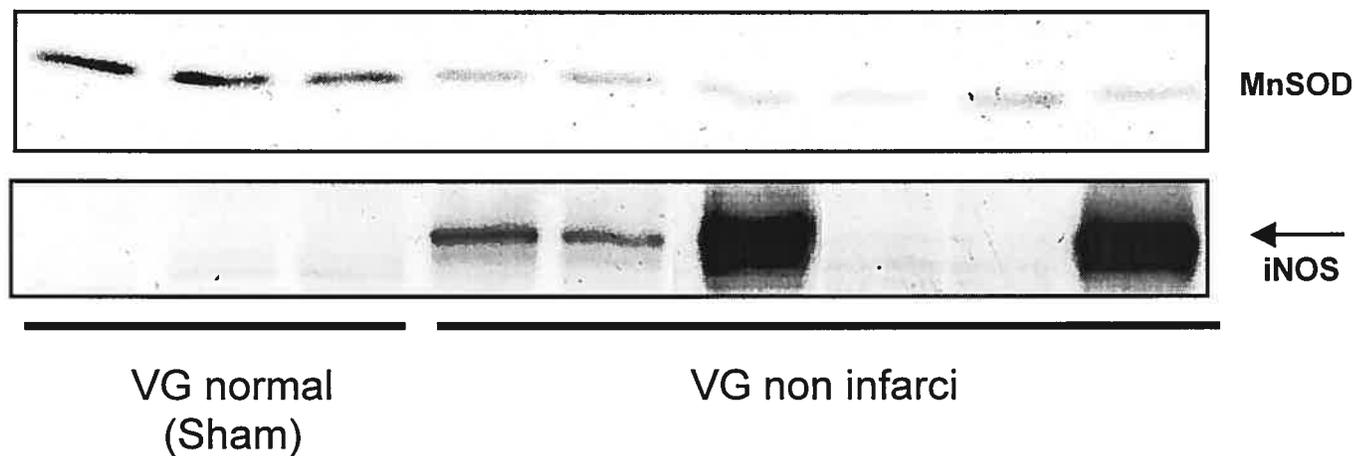


**Figure 12 Effet de la NE sur la phosphorylation de ERK et de P38 causée par SNAP dans les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés.**

Les NNMC sont prétraités avec NE 1  $\mu$ M pour 24 h avant d'être exposés à SNAP 100  $\mu$ M à différents temps tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. La phosphorylation de ERK1/2 et de P38 est évaluée par immunobuvardage tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. Fig 12A, représentation graphique de ERK totale phosphorylée. Fig 12B, western blot de ERK 1 (p44) et ERK 2 (p42). Fig 12C, représentation graphique de P38 phosphorylée. Fig 12D, western blot de P38. (n=3; \*p $\leq$ 0.05 versus courbe sans prétraitement avec NE)

#### **4. Niveau d'expression de la MnSOD et de la iNOS dans le ventricule gauche non infarci.**

Les résultats in vitro avec le SOD mimétique MnTBAP suggèrent que la manipulation des superoxydes dismutases bloque l'effet néfaste du NO sur la synthèse d'ADN des NNMC via la formation du  $\text{ONOO}^-$ . Ainsi, d'après ces données, l'effet compensatoire des SOD peut être aboli suite à une diminution de l'expression de ces enzymes in vivo. Ce qui amène l'intérêt dans l'investigation du rôle possible des SOD dans la régulation des effets du NO dans un modèle pathologique. Des études du laboratoire de Calderone démontrent que suite à un infarctus du myocarde, la fonction du ventricule gauche est diminuée et il y a augmentation de l'ANP, indice de l'induction de l'hypertrophie cardiaque. (Nguyen et al., 2003) Alors, suite à un infarctus du myocarde, l'expression de la MnSOD a été évaluée dans le ventricule gauche (VG) non infarci et le niveau d'expression moyen de la protéine est diminué de 45 %. Par contre, il y a parallèlement à ceci une induction en moyenne 5 fois plus supérieure de l'expression de iNOS dans 4 sur 6 rats ayant subi un infarctus myocardique comparé à aucune expression dans les animaux contrôles (sham). (Fig.13) Ces résultats montrent qu'une diminution de la MnSOD ne peut pas compenser l'augmentation de la production de NO par iNOS. Par contre, il est toujours possible que l'établissement de l'hypertrophie puisse compenser l'absence des SOD par un mécanisme ou plusieurs mécanismes non déterminés à date.



**Figure 13** Niveau d'expression de la MnSOD et de iNOS dans le ventricule gauche non infarci.

Des rats spragues Dawley ont subi une ligation de l'artère coronaire pour engendrer un infarctus du myocarde tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*. L'expression de MnSOD et de iNOS est évaluée par immunobuvardage tel que décrit dans *Matériel et Méthodes*.

## Discussion

Durant la croissance postnatale, le myocyte cardiaque est caractérisé par une brève période d'hyperplasie suivie par une période très allongée d'hypertrophie physiologique. Une fois atteint la phase adulte, ce type cellulaire ne subit aucun remodelage que durant une grossesse ou suite à de longues périodes d'entraînement physique. D'ailleurs, il est bien déterminé que durant ces dernières situations, ces changements sont purement physiologiques et réversibles. Par contre, malheureusement, certaines pathologies cardiovasculaires entraînent le myocyte cardiaque dans un remodelage pathophysiologique comme dans l'hypertension artérielle ainsi que l'infarctus du myocarde.

L'infarctus du myocarde a lieu suite à une ischémie myocardique causée par l'occlusion d'une artère coronaire privant ainsi cette région de l'apport en oxygène. Ceci provoque la mort des myocytes cardiaques ainsi que des fibroblastes cardiaques par apoptose ou par nécrose et déclenche, en conséquence, un mécanisme adaptatif. Ces cellules seront alors remplacées par des myofibroblastes qui formeront la cicatrice (fibrose réparative) tandis que dans la région non infarctée, il se produit une fibrose réactive. La fibrose consiste en la déposition de protéines de la matrice extracellulaire dont la collagène et la fibronectine. Parallèlement à ceci, autour de la région ischémique, les myocytes survivants subissent une hypertrophie eccentrica compensatoire (dilatation de la cavité ventriculaire). Graduellement, cette réponse atteint une limite et il y a détérioration de la fonction ventriculaire ; ce qui amène l'insuffisance cardiaque.

Traditionnellement, la mort du myocyte cardiaque de la région infarctée était associée avec le processus de nécrose. Mais, récemment, il a été prouvé que, durant le stade aigu, une proportion de la mort des cardiomyocytes est liée à l'apoptose. Des études, au niveau de tissus en provenance de patients morts d'un infarctus myocardique aigu, ont révélé que l'apoptose se trouvait en dominance dans les régions proches de l'infarctus que dans les régions éloignées. (Baldi et al., 2002) Ceci suggère que la région non infarctée du myocarde serait protégée de l'apoptose. En effet, dans cette région, une augmentation des protéines anti-apoptotiques, Bcl-2, et des protéines pro-apoptotiques, Bax a été observée. (Misao et al., 1996) De plus, dans le stade aigu de l'infarctus, il y a surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 tandis que dans le stade chronique, une surexpression du facteur pro-apoptotique Bax est notée. (Olivetti et al., 1996)

Depuis toujours, la communauté scientifique considère le myocyte cardiaque comme étant un type cellulaire différencié de façon terminale. Ce terme signifie que l'activité mitotique du myocyte se termine peu après la phase néonatale et que suite à cette période, le myocyte n'entame aucune division et du fait même, aucune possibilité de régénération. (Mima et al., 1995) D'ailleurs, la formation de la cicatrice cardiaque suite à un infarctus du myocarde est à la base de cet dogme qui considère le cœur composé de

myocytes incapables de se diviser. Par contre, depuis quelques années, le travail de certains chercheurs démontre qu'effectivement, dans le cœur adulte, le myocyte cardiaque a la capacité de se régénérer. Ainsi, le groupe de Beltrami a mesuré, en utilisant un anticorps monoclonal nommé Ki-67, les myocytes qui entrent dans le cycle cellulaire au niveau de cœurs de patients morts 4 à 12 jours après un infarctus du myocarde aigu. Initialement, le Ki-67 est un peptide très utilisé en clinique comme index de la prolifération cellulaire au niveau de plusieurs cancers. Cet anticorps détecte un antigène nucléaire présent seulement dans les cellules prolifératives et ce, au niveau de plusieurs stades de la division cellulaire soit G1, G2, S, et M. (Burger et al., 1986) Ainsi, les études de Beltrami supportent l'hypothèse de la possibilité de régénération du myocyte cardiaque qui contribue à l'augmentation de la masse musculaire du myocarde suite à un infarctus. (Beltrami et al., 2001) Par contre, cette régénération ne compense pas entièrement la perte des myocytes car il existe un penchant plus élevé pour la mort cellulaire que pour la croissance cellulaire. De plus, récemment, ce même groupe a montré la présence, dans le cœur, d'une sous-population de myocytes, appelés cellules de souches, possédant une capacité potentielle de se répliquer dans des conditions normales et pathologiques. (Beltrami et al., 2003) Alors, ceci redéfinit la position du cœur comme étant un organe non terminalement différencié possédant des cellules de souches qui supportent sa régénération.

Dans un environnement pathologique tel un milieu infarci, le myocyte cardiaque se trouve désormais en présence de plusieurs facteurs déterminant son sort. Des études ont montré que, chez des souris transgéniques surexprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-2, il y a une augmentation significative du pourcentage de myocytes qui rentrent dans le cycle cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'index mitotique. (Limana et al., 2002) La balance entre des facteurs hypertrophiques et anti-hypertrophiques détermine aussi le phénotype acquis par le myocyte cardiaque. De plus, au niveau de ce myocyte cardiaque, l'ANP est connu pour ses effets anti-hypertrophiques tandis que la NE provoque des effets hypertrophiques au niveau des myocytes cardiaques. (Horio et al., 2000) (Calderone et al., 1998)

Le monoxyde d'azote est un facteur anti-hypertrophique et anti-prolifératif sécrété considérablement dans une région ischémique. Au cours de cette étude, l'intérêt est porté sur l'effet de cette molécule sur le myocyte cardiaque. Il est bien démontré que le NO diminue la synthèse d'ADN et du fait même, la prolifération des fibroblastes cardiaques ainsi que des cellules du muscle lisse vasculaire de manière GMPc dépendante. (Yu et al., 1997) (Calderone et al., 1998) Le but fondamental de cette étude est de vérifier si le NO possède la même action inhibitrice sur la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques néonataux. Évidemment, si ce phénomène est présent, il est de grande importance d'investiguer quels sont le ou les mécanismes d'action impliqués.

Premièrement, l'efficacité des drogues utilisées a été testée au fur et à mesure. Cette étape de vérification s'avère essentielle afin de déterminer si, en premier lieu, SNAP stimule sa cascade de signalisation classique qui est la voie GMPc dépendante. (Arnold et al., 1977) Dans les myocytes cardiaques néonataux, SNAP 100  $\mu$ M stimule la production du GMPc intracellulaire. Par contre, l'utilisation en prétraitement de l'ODQ 10  $\mu$ M, un bloqueur de la GCs, empêche la production du GMPc par SNAP. (Fig. 1) L'ODQ inhibe la sensibilité du site hème de la GCs pour le NO par oxydation. Cette drogue est hautement sélective et son effet est irréversible. (Schrammel et al., 1996) (Garthwaite et al., 1995) Ainsi, dans les NNMC, SNAP 100  $\mu$ M stimule la guanylate cyclable soluble à produire le GMPc.

Pour répondre au premier but établi, les premières études consistent à regarder l'effet de SNAP sur la synthèse d'ADN des NNMC. En présence de thymidine marquée, il est possible de mesurer le taux d'incorporation de cette base nucléique dans la phase S du cycle cellulaire. Ceci reflète la synthèse d'ADN qui est un marqueur de l'état prolifératif d'une cellule. De plus, au niveau du myocyte cardiaque, l'augmentation de la synthèse d'ADN est aussi considérée comme un indice de polyploïdie. (Xiao et al., 2001) La polyploïdie est une augmentation du nombre de noyau dans la même cellule et a lieu

suite à la réplication de l'ADN suivie de l'arrêt de la mitose. Un grand nombre d'études démontre une augmentation de la polyploïdie durant des conditions pathologiques. (Storchova et Pellman, 2004) Tel que montré à la figure 2, la diminution de l'incorporation de la thymidine marquée au niveau des myocytes cardiaques révèle que SNAP provoque une diminution dose dépendante de la synthèse d'ADN. L'effet maximal de SNAP est observé à 100  $\mu\text{M}$  et provoque une baisse significative autour de 60% de la synthèse d'ADN.

Dans la littérature, une diminution de la synthèse d'ADN est souvent associée à une mort cellulaire par apoptose. Durant cette mort génétiquement régulée, la cellule subit, parmi plusieurs changements, une fragmentation de son ADN. Ce dernier phénomène peut être détecté à l'aide de la technique de TUNEL qui consiste à attacher un nucléotide biotin-dUTP, à l'aide de l'enzyme TDT, sur les parties 3' exposées de l'ADN. Les résultats du TUNEL sont purement qualitatifs et permettent de démontrer la présence de noyaux apoptotiques. Tel démontré par cette procédure, suite à l'exposition des NNMC durant 24 h à 100  $\mu\text{M}$  de SNAP, il est possible de visualiser quelques noyaux apoptotiques, comparé à la condition basale. (Fig. 3) Ces résultats montrent alors que l'apoptose observée au niveau des NNMC n'explique pas la diminution de la synthèse d'ADN par SNAP 100  $\mu\text{M}$  comparé au rayon UV.

Par la suite, établir la voie ou les voies par lesquelles SNAP diminue la synthèse d'ADN s'avère essentielle. La voie GMPc dépendante fut la première voie investiguée. L'utilisation de l'ODQ 10  $\mu\text{M}$  n'empêche pas la diminution de l'incorporation de la thymidine marquée. (Fig. 5) Même suite au prétraitement avec l'ODQ 10  $\mu\text{M}$ , SNAP 100  $\mu\text{M}$  cause une diminution de la synthèse d'ADN des NNMC. Ainsi, ceci démontre que la diminution dose dépendante de la synthèse d'ADN par SNAP semble être indépendante de la signalisation par le GMPc.

Ces résultats ont ainsi dirigé les expériences dans la direction des voies GMPc indépendantes activées par SNAP et plus spécifiquement la voie du peroxy-nitrite. Le peroxy-nitrite est une molécule potentiellement cytotoxique formée suite à la réaction irréversible du NO avec le  $\text{O}_2^-$  à une vitesse de  $6.7 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . (Keira et al., 2002) Malgré l'existence d'une grande gamme d'inhibiteurs de la voie du peroxy-nitrite, la préférence dans l'utilisation d'une drogue particulière plutôt qu'une autre est basée sur sa capacité d'engendrer le moins d'effet possible au niveau des NNMC non stimulés avec SNAP. Des études ont montré que, les agents métalloporphyriques, comme le MnTBAP, agissent comme des mimétiques des enzymes superoxydes dismutases. Cet agent pharmacologique inhibe les effets du peroxy-nitrite sans aucune action sur les molécules de NO présentes dans le milieu.

(Szabo et al., 1996) Ainsi, le MnTBAP fut utilisé pour bloquer la voie du peroxy-nitrite. Le MnTBAP 125  $\mu\text{M}$  ou 250  $\mu\text{M}$  empêche la diminution de la synthèse d'ADN causée par SNAP 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$ . (Fig. 6) Tel montré à la figure 5b, avec les prétraitements de la dose élevée de MnTBAP (250  $\mu\text{M}$ ), le traitement de SNAP 100  $\mu\text{M}$  cause une très faible diminution de la synthèse d'ADN. Alors, la diminution de la synthèse d'ADN des NNMC causée par SNAP 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  se fait de façon GMPc indépendante via le peroxy-nitrite.

Dans le but de réguler les multiples processus cellulaires, les signaux extracellulaires sont transmis vers les cibles intracellulaires via plusieurs réseaux de signalisation moléculaire assez complexes. Ainsi, les cellules répondent à plusieurs facteurs comme le stress, les cytokines, les hormones ainsi que les facteurs de croissance en activant certaines kinases et enzymes phosphatases appelées les MAPK comme les ERKs ainsi que le P38. Les MAPK sont une famille de protéines dépendantes des récepteurs tyrosines kinases. ERK 1/2 ont été identifiées comme des protéines de 42 kDa et 44 kDa dont l'activation requiert une double phosphorylation sur des résidus thréonines et tyrosines. Par la suite, la transmission du signal à travers ERK se fait suite à une série de phosphorylation sérine et thréonine en cascade. (Boulton et al., 1991) (Ruwhof et Van der Laarse, 2000)

Plusieurs études démontrent que ERK est impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'hypertrophie. (Seger et Krebs, 1995) Par contre, certaines études montrent son importance dans la transmission des effets anti-hypertrophiques de l'ANP au niveau des cardiomyocytes. (Silberbach et al., 1999) Ainsi, la variation dans les effets hypertrophiques et anti-hypertrophiques de cette protéine est dépendante de la nature du stimuli. P38 est une protéine kinase phosphorylée sur les résidus tyrosines et thréonines en réponse à une stimulation par les endotoxines lipopolysaccharides (LPS). (Han et al., 1994) (Raingeaud et al., 1995) Il existe plusieurs isoformes de P38 qui sont impliqués dans différentes fonctions dont la différenciation cellulaire, la réponse hypertrophique, la réponse au stress extracellulaire ainsi que les événements du cycle cellulaire. L'activation de la voie P38 joue un rôle essentiel dans la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et certaines interleukines. (Koh et Jiahuai, 2000) Beaucoup d'importance est accordée pour la régulation de ces voies de signalisation dans le développement des maladies cardiovasculaires. (Bogoyevitch, 2000) De plus, plusieurs études s'intéressent à l'implication de ERK et P38 dans les mécanismes de signalisation par le NO. Il est ainsi établi que les MAPK jouent un rôle important dans la réponse cellulaire produite par le NO. (Lander et al., 1996) (Levonen et al., 2001) Il est aussi connu que le peroxy-nitrite affecte les voies tyrosines kinases dépendantes par nitration ou par oxydation. (Klotz et al.,

2002) Alors, la prochaine étape était de voir de quelle façon le peroxy-nitrite affecte les kinases et plus spécifiquement ERK et P38.

Effectivement, suite au traitement des NNMC avec SNAP 100  $\mu\text{M}$ , il y a modification du patron de phosphorylation de ERK totale et P38. ERK totale subit une phosphorylation approximativement trois fois plus élevée que la condition basale. L'effet maximale est ainsi observé à 5 min et à 10 min avant le retour autour de 60 min à la valeur de base. (Fig. 4) SNAP 100  $\mu\text{M}$  cause aussi une phosphorylation très importante de P38. Par rapport au niveau de base, la phosphorylation de P38 est augmentée de 7 fois à 5 min et de 4 fois à 10 min. À 60 min, cette phosphorylation revient au niveau de base. (Fig. 4) Il a souvent été démontré que la phosphorylation de ERK et P38 est associée à son activation. (Calderone et al., 2000) Ainsi, il est possible d'affirmer qu'au niveau des NNMC, SNAP active ERK et P38. Par la suite, afin de déterminer l'implication de la voie de ERK et de P38 dans l'inhibition de la synthèse d'ADN par SNAP, des inhibiteurs de ces voies ont été utilisés. Le SB 203580 est un composé qui inhibe de manière spécifique l'activité de P38  $\alpha/\beta$ . Le PD 98095 se lie à la forme inactive de MEK1 empêchant son activation par Raf. Les expériences étaient non concluantes car les drogues utilisées ont, elles-mêmes, un effet inhibiteur sur les cellules. De plus, l'usage du MntBAP en prétraitement n'empêche pas l'activation de ERK et P38 par SNAP 100  $\mu\text{M}$  à 5 min et à 10 min. (Fig.7) Par contre, il est intéressant de noter que le

MnTBAP empêche la phosphorylation de ERK dans les cellules non stimulées par SNAP. Ainsi, la production des ions superoxydes de façon constitutive semble être essentielle dans l'activation de ERK de sorte que la présence d'un SOD mimétique comme le MnTBAP bloque cette phosphorylation. Ceci suggère que le peroxyde d'azote, responsable de la diminution de la synthèse d'ADN des NNMC, n'est pas impliqué dans l'activation de ERK et P38. Il y a ainsi une dissociation entre l'activation de ERK et P38 et la diminution de la synthèse d'ADN causée par SNAP.

En résumé, les études précédentes suggèrent que SNAP cause un effet inhibiteur dose dépendant sur la synthèse d'ADN des NNMC. Cet effet est GMPc indépendant et passe à travers une signalisation gouvernée par le peroxyde d'azote. Il est très connu que, en plusieurs conditions pathologiques et pathophysiologiques, il y a perturbation dans le taux de production de la molécule de NO. Ainsi, nous avons déterminé l'effet pathologique du NO au niveau du myocytes cardiaques hypertrophiés semble nécessaire.

Le processus hypertrophique est caractérisé par des changements au niveau du myocyte cardiaque qui provoque un phénomène appelé remodelage cardiaque. Ainsi, dépendamment de la forme de l'hypertrophie, la cavité cardiaque subit des altérations dans sa géométrie ainsi que dans sa grandeur. Cette réponse est physiologique, adaptative et bénéfique au

rétablissement de la fonction cardiaque. Elle augmente le nombre des éléments contractiles, diminue le stress sur la paroi (wall stress) en augmentant l'épaisseur de la paroi (hypertrophie concentrique) ou cause une dilatation de la cavité ventriculaire afin d'augmenter le volume à la fin de la diastole et par le fait même, augmenter le volume d'éjection (hypertrophie eccentric) (Wollert et Drexler, 2002) En plus de ces modifications, le myocyte cardiaque subit plusieurs changements génotypiques et phénotypiques. Il y a alors réorganisation des filaments d'actine  $\alpha$ -sarcomérique ainsi que réexpression, au niveau ventriculaire, de certains gènes foétaux comme l'expression de l'ANP auriculaire au niveau du ventricule. De plus, il y a transition de la forme  $\alpha$ -MHC à  $\beta$ -MHC. (Sugden et Clerk, 1998) (Ruwhof et Van der Laarse, 2000)

L'action anti-hypertrophique du NO au niveau des cellules cardiaques est un processus bien connu. Ce phénomène a été initialement démontré chez des rats hypertensifs (SHR). (Matsuoka et al., 1996) Le NO agit via la voie GMPc dépendante afin de prévenir l'établissement de cette hypertrophie. (Calderone et al., 1998) Jusqu'à présent, aucune étude a investigué l'importance de l'établissement de l'hypertrophie sur l'action pathologique du NO au niveau de la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques. Ainsi, au cours de cette étude, l'intérêt est porté sur la vérification de l'hypothèse suivante : l'effet pathologique du NO est diminué dans les myocytes cardiaques hypertrophiés. Alors, toutes les expériences précédentes ont été

répétées sur des NNMC prétraitées avec 1  $\mu\text{M}$  de NE pendant 24 h. La NE, un neurotransmetteur du système nerveux sympathique, est un agoniste des récepteurs adrénergiques  $\alpha$  et  $\beta$ . (Graham, 1990) La NE possède plusieurs actions dont des effets inotropes et chronotropes positifs par les récepteurs  $\beta$ -1. (Simpson, 1983) De plus, la NE est un stimulus potentiel de la croissance hypertrophique du myocyte ventriculaire et cet effet se fait via l'activation des récepteurs  $\alpha$ -1. (Amin et al., 2001) Ces récepteurs  $\alpha$ -1 adrénergiques sont couplés à des protéines G qui activent plusieurs voies de signalisation comme la PLC, PKC, la voie du PI3-K et des MAPK. D'ailleurs, l'activation des MAPK est un pré-requis pour les changements morphologiques et transcriptionnels du myocyte cardiaque hypertrophié. (Glennon et al., 1996) Par immunocytochimie, il est possible de vérifier l'établissement de l'hypertrophie et ce, par l'augmentation de la taille des NNMC ainsi que la réorganisation des filaments d'actine visualisées par microscopie confocale. (Fig. 9)

Au niveau des NNMC hypertrophiés, il y a inhibition de la diminution de la synthèse d'ADN causée par SNAP. Tel démontré par la Figure 10, suite aux prétraitements avec NE 1  $\mu\text{M}$ , la synthèse d'ADN observée avec les hautes concentrations de SNAP est diminuée partiellement. La grande diminution dans l'effet inhibiteur de SNAP est surtout observée à la concentration de SNAP 50  $\mu\text{M}$  comparativement à la concentration de SNAP 100  $\mu\text{M}$ . Il est évident qu'à une dose de 100  $\mu\text{M}$ , il y a une production plus

élevée de  $\text{ONOO}^-$  qu'à une dose de  $50 \mu\text{M}$ . Il devient alors plus difficile de contrer les effets de cette molécule. Ainsi, les prétraitements de NE empêchent partiellement l'action néfaste que SNAP a sur la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques.

L'endothéline-1 (ET-1) fut aussi utilisée afin de vérifier si les résultats précédents reflètent l'effet de l'hypertrophie et non l'effet de l'usage d'une substance hypertrophique particulière plutôt qu'une autre. Le facteur hypertrophique ET-1 fait partie de la famille des endothélines (ET-1, ET-2 et ET-3), peptides de 21 aa, qui sont produites par plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales et épithéliales, les macrophages, les fibroblastes et les myocytes cardiaques. (Ito et al., 1991) Les récepteurs aux endothélines (ET-A et ET-B) sont présents sur plusieurs cellules dont les cellules du muscle lisse vasculaire, les myocytes et les fibroblastes. (Battistini et al., 1993) Ces peptides sont encodés par 3 gènes différents qui donnent une molécule de 39 résidus appelée Big-endothéline qui sera, par la suite, clivée en une séquence de 21 aa afin de donner les endothélines. En plus d'induire l'hypertrophie vasculaire, les endothélines sont des vasoconstricteurs puissants. (Tamirisa et al., 1995) Alors, les mêmes protocoles de prétraitements répétés avec  $10 \text{ nM}$  d'ET-1 donnent des résultats similaires aux prétraitements de NE  $1 \mu\text{M}$ . L'effet maximal est observé à la concentration SNAP  $50 \mu\text{M}$  où il y a une grande diminution de la

synthèse d'ADN du NNMC hypertrophiés comparé à la valeur des NNMC non hypertrophiés. (Fig. 10) Ces résultats suggèrent fortement que l'induction de l'hypertrophie et non les facteurs hypertrophiques est responsable de la modification de l'effet inhibiteur de SNAP sur la synthèse d'ADN au niveau des NNMC.

La suite des expériences avait comme but de vérifier si l'induction de l'hypertrophie dans les NNMC affecte la phosphorylation de ERK et P38 ainsi que la présence de noyaux apoptotiques observées avec SNAP 100  $\mu$ M. Ainsi, au niveau des NNMC hypertrophiés, SNAP 100  $\mu$ M n'induit pas la légère apoptose présente au niveau des NNMC non hypertrophiés. (Fig.11) Les prétraitements avec la NE empêchent aussi la stimulation des deux sous-unités de ERK ainsi que la stimulation de P38 par SNAP 100  $\mu$ M. (Fig.12) Ainsi, ceci suggère la capacité de l'hypertrophie à inhiber la diminution de la synthèse d'ADN SNAP dépendante et l'activation des voies de signalisation intracellulaire comme ERK et P38.

Parallèlement à ces données, le mécanisme d'action impliqué dans l'effet protecteur de l'hypertrophie fut investigué. Puisque le MnTBAP, un SOD mimétique, empêche la diminution de la synthèse d'ADN par SNAP, l'expression des SOD a été évaluée dans les NNMC traités à la NE. Les

résultats préliminaires démontrent que les niveaux d'expression de la MnSOD ne sont pas augmentés dans les NNMC suite à la stimulation par la NE 1  $\mu\text{M}$  pour 24 h (n=2 ; résultats non montrés). Ce qui implique que l'induction de l'hypertrophie in vitro n'active pas la MnSOD.

Les résultats précédents ont poussé l'intérêt de l'étude dans la détermination du mécanisme de protection par lequel l'hypertrophie diminue l'effet inhibiteur de SNAP sur la synthèse d'ADN des NNMC. Il est connu que, dans les cœurs de rats hypertrophiés, il y a augmentation de l'activité enzymatique antioxydante par une surexpression ou une augmentation de l'activité des SOD endogènes ou des glutathiones peroxidases (GSHPx). (Kirshenbaum et Singal, 1992) Par contre, certaines études n'ont pas observé une augmentation dans l'expression ou l'activité des enzymes antioxydantes avec l'induction de l'hypertrophie. (Balta et al., 1999) (Kamiya et al., 2001) Nous avons alors investigué le statut expressif de ces enzymes antioxydantes dans un milieu pathophysiologique tel un infarctus du myocarde. Ceci a été vérifié avec des expériences in vivo regardant l'expression de la MnSOD et l'expression de iNOS suite à un infarctus du myocarde. Dans la région non infarctée, il y a diminution de l'expression de la MnSOD et augmentation de l'expression de iNOS. (Fig. 13) Ces résultats impliquent alors que, suite à un infarctus, le myocyte cardiaque de la région non infarctée est exposé à une production importante de  $\text{ONOO}^-$  dû à sa présence dans un milieu favorable à la production de cette molécule. Ainsi, dans le ventricule gauche non infarcté,

il y a à la fois une augmentation de l'expression de l'isoforme inducible de NOS qui produit les grandes quantités de NO et une diminution du système de protection qui empêche la production du  $\text{ONOO}^-$ .

Ces données démontrent que le remodelage cardiaque peut être susceptible à l'action du  $\text{ONOO}^-$ . L'hypertrophie est une composante importante de ce remodelage. De plus, la présence de cellules souches a été démontré dans le myocarde et des études ont montré la capacité du myocyte cardiaque adulte à se répliquer. Ainsi, la présence du  $\text{ONOO}^-$ , molécule cytotoxique, pourrait agir en diminuant la synthèse d'ADN de ces myocytes cardiaques ainsi que des cellules souches. Par contre, la présence d'une hypertrophie peut compenser par un mécanisme inconnu à date les effets néfastes de iNOS dans les myocytes cardiaques comme démontré dans les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés isolés.

# Conclusion

Le monoxyde d'azote est un gaz qui joue un rôle fondamental dans plusieurs fonctions physiologiques et pathophysiologiques. Cette molécule est importante dans la maintenance de l'homéostasie mais, via la formation de peroxy-nitrite, elle agit aussi comme un agent cytotoxique potentiel impliqué dans la pathogénèse de plusieurs maladies. Cette étude démontre que le NO possède une action inhibitrice dose dépendante sur la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques néonataux non reliée au processus d'apoptose. Cet effet se fait de façon GMPc indépendante, spécifiquement par la formation du peroxy-nitrite issu d'une réaction entre le NO et un ion superoxyde. De plus, l'exposition des NNMC à des doses élevées de SNAP activent les voies de signalisation de ERK et P38. Par contre, l'activation de ces voies semble être dissociée de la diminution SNAP dépendante de la synthèse d'ADN. Cette étude investigate aussi le comportement des myocytes cardiaques hypertrophiés face aux effets de SNAP. L'hypertrophie est une composante importante du remodelage cardiaque et constitue un mécanisme adaptatif et essentiel ayant lieu suite à une surcharge. Il semble alors que l'induction, in vitro, d'un phénotype hypertrophique procure au myocyte cardiaque une certaine résistance contre l'action du NO en modulant à la baisse l'effet pathologique de cette molécule sur la synthèse d'ADN des NNMC. L'hypertrophie diminue partiellement l'inhibition dose-dépendante de SNAP sur la synthèse d'ADN des NNMC. Par contre, cette hypertrophie bloque complètement l'apoptose ainsi que la phosphorylation de ERK et de P38. Pour terminer, les études au niveau de l'infarctus du myocarde déterminent que l'expression de la MnSOD est diminuée parallèlement à une

augmentation de iNOS. Cette débalance favorise l'effet néfaste de iNOS suite à la production du peroxy-nitrite. La présence de l'hypertrophie peut quand même compenser l'effet néfaste du NO par des mécanismes non connus à présent.

Les buts ultérieurs de cette étude sont nombreux dont la détermination, *in vitro*, du processus par lequel le peroxy-nitrite diminue la synthèse d'ADN des myocytes cardiaques de nouveau-nés. Parallèlement à ceci, il est intéressant de vérifier par quel mécanisme l'hypertrophie bloque l'effet inhibiteur de la synthèse d'ADN par SNAP. En se basant sur la théorie de régénération du myocyte cardiaque, il est aussi possible de faire des études *in vivo*. Dans le but de créer un milieu favorable aux myocytes cardiaques de la région non infarctée, ces études consisteraient à utiliser un bloqueur de iNOS afin d'investiguer la possibilité des myocytes cardiaques adultes d'entamer une division cellulaire.

## Références

Abdelaziz N, Colombo F, Mercier I, Calderone A. Nitric oxide attenuates the expression of transforming growth factor-beta(3) mRNA in rat cardiac fibroblasts via destabilization. *Hypertension*. 2001 Aug;38(2):261-6.

Abu-Soud HM, Feldman PL, Clark P, Stuehr DJ. Electron transfer in the nitric-oxide synthases: characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction. *J Biol Chem*. 1994;269:32318-32326.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.

Amin JK, Xiao L, Pimental DR, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Reactive oxygen species mediate alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Jan;33(1):131-9.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Aug;74(8):3203-7.

Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res*. 1999 Oct 29;85(9):829-40.

Assayag P, Carre F, Chevalier B, Delcayre C, Mansier P, Swynghedauw B. Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis. *Cardiovasc Res*. 1997 Jun;34(3):439-44.

Assem M, Teyssier JR, Benderitter M, Terrand J, Laubriet A, Javouhey A, David M, Rochette L. Pattern of superoxide dismutase enzymatic activity and RNA changes in rat heart ventricles after myocardial infarction. *Am J Pathol*. 1997 Aug;151(2):549-55.

Azatian KV, White AR, Walker RJ, Ayrapetyan SN. Cellular and molecular mechanisms of nitric oxide-induced heart muscle relaxation. *Gen Pharmacol*. 1998 Apr;30(4):543-53.

Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1992;54:227-241.

Baldi A, Abatte A, Bussani R, Patti G, Melfi R, Angelini A, Dobrina A, Rossiello R, Silvestri F, Baldi F, Di Sciascio G. Apoptosis and Post-infarction left Ventricular Remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 ;34(2) :165-174.

Ball SG. The sympathetic nervous system and converting enzyme inhibition. *J cardiovasc Pharmacol*. 1989;13(suppl 3) : S17-S21.

Balligand JL, Cannon PJ . Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Oct;17(10):1846-58.

Balta N, Stoian I, Petec C, Petec G. Decreased SOD activity and increased nitrates level in rat heart with left ventricular hypertrophy induced by isoproterenol. *Rom J Physiol.* 1999 Jul-Dec;36(3-4):175-82.

Barakat AI, Davies PF. Mechanisms of shear stress transmission and transduction in endothelial cells. *Chest.* 1998 Jul;114(1 Suppl):58S-63S.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002 Mar 21;416(6878):337-9.

Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides.* 1993 Mar-Apr;14(2):385-99.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 1996. 271, pp. C1424–C1437.

Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002 Nov 21;90(10C):40L-48L.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):763-76.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami C A, Anversa P. Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine.* Volume 344(23):1750-1757. June 7, 2001. Number 23.

Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1472-8.

Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2000 Mar;45(4):826-42.

Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Sep;285(3):C499-508.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991 May 17;65(4):663-75.

Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol*. 1986 Sep;10(9):611-7.

Calderone A. The therapeutic effect of natriuretic peptides in heart failure; differential regulation of endothelial and inducible nitric oxide synthases. *Heart Fail Rev*. 2003 Jan;8(1):55-70.

Calderone A, Abdelaziz N, Colombo F, Schreiber KL, Rindt H.A farnesyltransferase inhibitor attenuates cardiac myocyte hypertrophy and gene expression. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Jun;32(6):1127-40.

Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):812-8.

Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 2002 Oct;23(5):665-86.

Champion HC, Skaf MW, Hare JM. Role of nitric oxide in the pathophysiology of heart failure. *Heart Fail Rev.* 2003 Jan;8(1):35-46.

Chen QM, Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2002; 2(1): 43-57.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 1999 Jan 29;443(3):285-9.

Chesnais JM, Fischmeister R, Mery PF. Peroxynitrite is a positive inotropic agent in atrial and ventricular fibres of the frog heart. *J Physiol.* 1999 Dec 1;521 Pt 2:375-88.

Chun TY, Bloem LJ, Pratt JH. Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology.* 2003 May;144(5):1712-7.

Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 30; 99(9): 6252-6. Epub 2002 Apr 23.

Daniliuc S, Bitterman H, Rahat MA, Kinarty A, Rosenzweig D, Nitza L. Hypoxia inactivates inducible nitric oxide synthase in mouse macrophages by disrupting its interaction with alpha-actinin 4. *J Immunol*. 2003 Sep 15;171(6):3225-32.

Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase promoter activity through nuclear factor Kappa-B binding. *J Biol Chem*. 2004 Jan 2;279(1):163-8. Epub 2003 Oct 21.

De Gasparo M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev*. 2002 Oct;7(4):347-58.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999 Jun 10;399(6736):601-5.

Estevez AG, Jordan J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May; 962: 207-11.

Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol.* 2003Feb;138(4):532-43.

Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Sep;281(3):L529-33.

Fisher SA, Langille BL, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res.*2000 Nov10;87(10):856-64.

Fisslthaler B, Benzing T, Busse R, Fleming I. Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide.* 2003 Jun;8(4):253-61.

Flick MJ, Konieczny SF. The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of beta1-spectrin. *J Cell Sci.* 2000 May;113 ( Pt 9):1553-64.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*1980 Nov 27;288(5789):373-6.

Gao CQ, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, Csont T, Wozniak M, Ferdinandy P, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2003 Feb;57(2):426-33.

Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 1995 Aug;48(2):184-8.

Gerdes AM, Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995 Mar;27(3):849-56.

Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sugden PH. Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 1996;78:954-961.

Goretski J, Hollocher TC. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem.* 1988; 263(5):2316-23.

Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Feb;280(2):F193-206.

Graham RM. Adrenergic receptors: structure and function. *Cleve Clin J Med*. 1990 Jul-Aug;57(5):481-91.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase : role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17; 86(5) : 494-501.

Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y, Bolli R. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11507-12.

Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth K, Literati-Nagy P, Sumegi B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol*. 2001 Jun;59(6):1497-505.

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994 Aug 5;265(5173):808-11.

Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*, 2001; 7(4):801-819.

Hangaishi M, Nakajima H, Taguchi J, Igarashi R, Hoshino J, Kurokawa K, Kimura S, Nagai R, Ohno M. Lecithinized Cu, Zn-superoxide dismutase limits the infarct size following ischemia-reperfusion injury in rat hearts in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 3;285(5):1220-5.

Hattori R, Sase K, Eizawa H, Kosuga K, Aoyama T, Inoue R, Sasayama S, Kawai C, Yui Y, Miyahara K, et al. Structure and function of nitric oxide synthases. *Int J Cardiol*. 1994 Dec;47(1 Suppl):S71-5.

Heineke J, Kempf T, Kraft T, Hilfiker A, Morawietz H, Scheubel RJ, Caroni P, Lohmann SM, Drexler H, Wollert KC. Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation*. 2003 Mar 18;107(10):1424-32.

Hildick-Smith DJR, Shapiro LM. Echocardiographic differentiation of pathological and physiological left ventricular hypertrophy. *Heart* 2001;85:615-619.

Hille R, Nishino T. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J*. 1995 Aug;9(11):995-1003.

Hoit BD. Two faces of nitric oxide: lessons learned from the NOS2 knockout. *Circ Res*. 2001 Aug 17;89(4):289-91.

Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 1):19-24.

Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Aug;15(8):1255-61.

Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 6;305(3):776-83.

Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1991 Jul;69(1):209-15.

Jourd'heuil D, Jourdeuil FL, Kutchukian PS, Musah RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for

peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. *J Biol Chem.* 2001 Aug 3; 276(31): 28799-805. Epub 2001 May 23.

Ju H , Zhao S, Tappia PS, Panagia V, Dixon IM. Expression of Gq alpha and PLC-B in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation.*1998;97: 892-9.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18522-5.

Jugdutt BI. Nitric oxide in heart failure: friend or foe. *Heart Fail Rev.* 2002 Oct;7(4):385-9.

Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev.* 2002 Oct;7(4):391-405.

Jugdutt BI. Nitric oxide and cardiovascular protection. *Heart Fail Rev.* 2003 Jan;8(1):29-34.

Kajstura J, Leri A, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am.* 2004 Feb;84(1):161-77.

Kamiya H, Okumura K, Ito M, Matsui H, Saburi Y, Hayashi K, Hayakawa T. Antioxidant changes in the hypertrophied heart due to energy metabolic disorder. *Basic Res Cardiol*. 2001 Sep;96(5):431-8.

Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem*. 1986 Jun 5;261(16):7236-41.

Keaney JF Jr, Hare JM, Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS. Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol*. 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2646-52.

Keira N, Tatsumi T, Matoba S, Shiraishi J, Yamanaka S, Akashi K, Kobara M, Asayama J, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M. Lethal effect of cytokine-induced nitric oxide and peroxynitrite on cultured rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 May; 34(5): 583-96.

Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res*. 1999 Feb 19;84(3):253-6.

Kirshenbaum LA, Singal PK. Antioxidant changes in heart hypertrophy: significance during hypoxia-reoxygenation injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992 Oct;70(10):1330-5.

Klotz LO, Schroeder P, Sies H. Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 15; 33(6): 737-43.

Knowlton AA, Gupta S. HSP60, Bax, and cardiac apoptosis. *Cardiovasc Toxicol.* 2003;3(3):263-8.

Koga T, Zhang WY, Gotoh T, Oyadomari S, Tanihara H, Mori M. Induction of citrulline-nitric oxide (NO) cycle enzymes and NO production in immunostimulated rat RPE-J cells. *Exp Eye Res.* 2003 Jan;76(1):15-21.

Koh Ono, Jiahuai Han. The p38 signal transduction pathway Activation and function. *Cellular Signalling* 12 (2000) 1-13.

Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II alpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):28139-43.

Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Japanese Circulation Journal.* 2001 May;65(5):353-8.

Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem.* 1996 Aug 16;271(33):19705-9.

Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2002 Apr 15;540(Pt 2):457-67.

Levonen AL, Patel RP, Brookes P, Go YM, Jo H, Parthasarathy S, Anderson PG, Darley-Usmar VM. Mechanisms of cell signaling by nitric oxide and peroxynitrite: from mitochondria to MAP kinases. *Antioxid Redox Signal.* 2001 Apr;3(2):215-29.

Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240 : 419-424.

Lida S, Ohshima H, Oguchi S, Hata T, Suzuki H, Kawasaki H, Esumi H. Identification of inducible calmodulin-dependent nitric oxide synthase in the liver of rats *J. Biol. Chem.*, Vol. 267, Issue 35, 25385-25388, 12, 1992.

Limana F, Urbanek K, Chimenti S, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Izumo S, Anversa P. bcl-2 overexpression promotes myocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):6257-62.

Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*. 1996 Oct 15;35(41):13277-81.

Lopez-Farre A, Rodriguez-Feo JA, Garcia-Colis E, Gomez J, Lopez-Blaya A, Fortes J, de Andres R, Rico L, Casado S. Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the alpha1 -receptor blocker doxazosin. *J Hypertens*. 2002 Mar;20(3):463-70.

Loppnow H, Westphal E, Buchhorn R, Wessel A, Werdan K. Interleukin-1 and related proteins in cardiovascular disease in adults and children. *Shock*. 2001; 16 Suppl 1: 3-9.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994 Feb 1;120(3):227-37.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 2000; 52(3): 375-414.

Mackenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res.* 2000 May; 46(2): 257-63.

Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology.* 1995;146(1):3-15.

Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2. 1998 : 656–663.

Marley R, Patel RP, Orie N, Ceaser E, Darley-Usmar V, Moore K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2001 Sep 1;31(5):688-96.

Massion PB, Balligand JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol.* 2003 Jan 1;546(Pt 1):63-75.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, Imaizumi T. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1996 Jan;27(1):14-8.

Mazzag BM, Tamaresis JS, Barakat AI. A model for shear stress sensing and transmission in vascular endothelial cells. *Biophys J*. 2003 Jun;84(6):4087-101.

McQuillan, LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, and Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H1921-H1927, 1994.

Mercier I, Pham-Dang M, Clement R, Gosselin H, Colombo F, Rouleau JL, Calderone A. Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET(A) receptor antagonist therapy: absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2002 Jul;136(5):685-92.

Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca<sup>2+</sup> current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 15;88(4):1197-201.

Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T. Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan 17;92(2):467-71.

Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of Bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and bax an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996;94:1506-1512.

Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol*. 2003 Mar3;160(5):719-27. Epub 2003 Feb 25.

Munch G, Bolck B, Hoischen S, Brixius K, Bloch W, Reuter H, Schwinger RH. Unchanged protein expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, phospholamban, and calsequestrin in terminally failing human myocardium. *J Mol Med*. 1998 May;76(6):434-41.

Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):735-43.

Nakajima H, Hangaishi M, Ishizaka N, Taguchi J, Igarashi R, Mizushima Y, Nagai R, Ohno M. Lecithinized copper, zinc-superoxide dismutase ameliorates ischemia-induced myocardial damage. *Life Sci*. 2001 Jul 13;69(8):935-44.

Narula J, Haider N, Virmani R. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl Med* 1996;335:1182-1189.

Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994 May 13;269(19):13725-8.

Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF- $\alpha$  induces a decrease in eNOS-promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Feb;286(2):L452-9. Epub 2003 Oct 10.

Nishizawa J, Nakai A, Komeda M, Ban T, Nagata K. Increased preload directly induces the activation of heat shock transcription factor 1 in the left ventricular overloaded heart. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 1;55(2):341-8.

Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Tada M, Hori M, Kamada T. Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circulation*. 1996 Jan 15;93(2):356-64.

Nguyen QT, Colombo F, Clement R, Gosselin H, Rouleau JL, Calderone A. AT1 receptor antagonist therapy preferentially ameliorated right ventricular function and phenotype during the early phase of remodeling post-MI. *Br J Pharmacol*. 2003 Apr;138(8):1485-94.

Ohno M, Gibbons GH, Dzau VJ, Cooke JP. Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation*. 1993 Jul;88(1):193-7.

Olivetti G., Quaini F., Sala R., Lagrasta C., Corradi D., Bonacina E., Gambert S.R., Cigalo E., Anversa P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J.Mol.Cell.Cardiol*. 1996;28:2005-2016.

Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Mar;284(3):R628-38.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

Paolocci N, Ekelund UE, Isoda T, Ozaki M, Vandegaer K, Georgakopoulos D, Harrison RW, Kass DA, Hare JM. cGMP-independent inotropic effects of nitric oxide and peroxynitrite donors: potential role for nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Oct;279(4):H1982-8.

Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai JC, Hsieh CM, Kourembanas S and Lee ME. Transforming growth factor-beta 1, but not dexamethasone, down-

regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin- 1 beta in rat smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, Vol. 269, Issue 20, 14595-14600, 05, 1994.

Rafikova O, Rafikov R, Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 30;99(9):5913-8.

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31; 270(13): 7420-6.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* 1994 Oct 21;269(42):26066-75.

Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular research* 47(2000)23-37.

Sabbah Hani N. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovascular Research* 45 (2000) 704-712.

Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(22):8664-7.

Sam F, Sawyer DB, Xie Z, Chang DL, Ngoy S, Brenner DA, Siwik DA, Singh K, Apstein CS, Colucci WS. Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001 Aug 17;89(4):351-6.

Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med*. 2003 ;35(1) :21-7.

Schnkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression, in pressure overload left ventricular hypertrophy: Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990;86:1913-1920.

Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*. 1996 Jul;50(1):1-5.

Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M.  $\alpha$ -Skeletal muscle actin mRNAs accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res* 1986;59:551-555.

Schwinger RH, Bohm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause EG, Erdmann E. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation*. 1995 Dec 1;92(11):3220-8.

Sears CE, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, Neubauer S, Terrar DA, Casadei B. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res*. 2003 Mar 21;92(5):e52-9. Epub 2003 Mar 06.

Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995 Jun; 9(9): 726-35.

Seko Y, Takahashi N, Shibuya M, Yazaki Y. Pulsatile stretch stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion by cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:462-465.

Sen S, Kundu G, Mekhail N, Castel J, Misono K, Healy B. Myotrophin: purification of a novel peptide from spontaneously hypertensive rat heart that influences myocardial growth, *J Biol Chem* 1990;265:16635-16643.

Sernerì GG, Modesti PA, Boddi M, Cecioni I, Paniccia R, Coppo M, Galanti G, Simonetti I, Vanni S, Papa L, Bandinelli B, Migliorini A, Modesti A, Maccherini M, Sani G, Toscano M. Cardiac growth factors in human hypertrophy. Relations with myocardial contractility and wall stress. *Circ Res.* 1999 Jul 9;85(1):57-67.

Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, Stork PJ, Steyger PS, Roberts CT Jr. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27; 274(35): 24858-64.

Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest.* 1983 Aug;72(2):732-8.

Song Y, Zweier JL, Xia Y. Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binding. *Biochem J*. 2001 Apr 15;355(Pt 2):357-60.

Sowa, G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes T, and Sessa WC. Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. *J Biol Chem* 274: 22524-22531, 1999.

Sperelakis N, Xiong Z, Haddad G, Masuda H. Regulation of slow calcium channels of myocardial cells and vascular smooth muscle cells by cyclic nucleotides and phosphorylation. *Mol Cell Biochem*. 1994 Nov 23;140(2):103-17.

Stewart VC, Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*. 2003 Feb 1;34(3):287-303.

Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Jan;5(1):45-54.

Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*. 1998 Nov 6;438(3):161-4.

Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* 1998;76:725-746.

Sutton M, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction. Pathophysiology and therapy. *Circulation.*2000;101:2981-2988.

Swynghedauw B. Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiological Rev.* 1999 Jan;79(1):215-62.

Szabolcs M, Michler RE, Yang X, Aji W, Roy D, Athan E, Sciacca RR, Minanov OP, Cannon PJ. Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase. *Circulation.* 1996 Oct 1;94(7):1665-73.

Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):30821-7. Epub 2003 Jun 10.

Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease. *Am Heart J.* 1995 Sep;130(3 Pt 1):601-10.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res.* 2003 Feb;37(2):121-7.

Vaziri ND, Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension.* 1999 Dec;34(6):1237-41.

Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC. Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem.* 1997 Nov 7;272(45):28187-90.

Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem.* 1996 Mar 15;271(11):6435-40.

Viner RI, Williams TD, Schoneich C. Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important

cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry*. 1999 Sep 21;38(38):12408-15.

Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 2003 Apr 11;volume 140-141:113-24.

Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 1):L1026-33.

Wang D, Yang XP, Liu YH, Carretero OA, LaPointe MC. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Am J Hypertens*. 1999 Feb;12(2 Pt 1):174-82.

Wang MX, Murrell DF, Szabo C, Warren RF, Sarris M, Murrell GA. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide*. 2001 Jun;5(3):219-32.

Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 33: 894-899, 1999.

Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the

p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):2161-8.

Woldbaek PR, Tonnessen T, Henriksen UL, Florholmen G, Lunde PK, Lyberg T, Christensen G. Increased cardiac IL-18 mRNA, pro-IL-18 and plasma IL-18 after myocardial infarction in the mouse; a potential role in cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2003 Jul 1; 59(1):122-31.

Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev.* 2002 Oct;7(4):317-25.

Wu Kk. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;962:122-30.

Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC. Myocardial ischemia/reperfusion injury in the inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Life Sci.* 1999;65(9):935-45.

Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem.* 1998 Oct 2;273(40):25804-8.

Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem*. 1998 Aug 28;273(35):22635-9.

Xiao G, Mao S, Baumgarten G, Serrano J, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC, MacLellan WR. Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. *Circ Res*. 2001 Dec 7;89(12):1122-9.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19;96(2):657-62.

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1996;271:3221-3228.

Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res*. 1997 Feb;33(2):422-32.

Yoshida M, Xia Y. Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):36953-8.

Yu SM, Hung LM, Lin CC. cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibiting the activation of epidermal growth factor signaling pathway. *Circulation*. 1997 Mar 4;95(5):1269-77.

Zak R, Martin AF, Reddy MK, Rabinowitz M. Control of protein balance in hypertrophied cardiac muscle. *Circ Res*. 1976 May;38(5 Suppl 1):145-50.

Zhang Q, Yan L, Weiss HR, Scholz PM. Cyclic GMP-induced reduction in cardiac myocyte function is partially mediated by activation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Pharmacology*. 2002 Feb;64(2):106-12.

Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, and Komuro I. Ca/Calmodulin-dependent Kinase II and Calcineurin Play Critical Roles in Endothelin-1 Cardiomyocyte Hypertrophy. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000 ;275 :15239-15245.